

# Untersuchung der microRNA-Expression in metastasierten Nierenzellkarzinomen in Korrelation zum klinischen Verlauf

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Brenda Henning  
geboren am 03.12.1986 in Weimar

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Kerstin Junker, Homburg/Saar
2. Prof. Dr. rer. nat. Walburgis Brenner, Mainz
3. Prof. Dr. rer. nat. Alexander Berndt, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.12.2013

## Abkürzungsverzeichnis

Ago-Protein	—	Argonautprotein
AUC	—	Area Under Curve
Bcl-2	—	B-cell Lymphoma 2
bp	—	Base Pair
BSG	—	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CP	—	Crossing Point
cDNA	—	Komplementäre DNA
CGH	—	Comparative Genomic Hybridization
CT	—	Computertomographie
DGCR	—	DiGeorge Syndrome Chromosome Region
DMEM	—	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	—	Dimethylsulfoxid
DNA	—	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	—	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	—	Epithelial-mesenchymale Transition
EZH2	—	Enhancer Of Zeste Homolog 2
FISH	—	Fluorescent In Situ Hybridization
FKS	—	Fetales Kälberserum
HIF	—	Hypoxie Induzierter Faktor
HMGA 2	—	High-mobility Group AT-hook 2
IFN	—	Interferon
KDR	—	Kinase Insert Domain Receptor
LOH	—	Loss Of Heterozygosity
MEM	—	Minimum Essential Medium
mRNA	—	MessengerRNA
miRNA	—	MicroRNA
MOCK	—	Ausschließlich mit Transfektionsreagenz versetzte Zellen
MRT	—	Magnetresonanztomographie
m-TOR	—	Mammalian Target Of Rapamycin
n	—	Anzahl der Proben
nt	—	Nukleotide
NTC	—	No Template Control
NZK	—	Nierenzellkarzinom
p	—	Signifikanzwert
PAZ	—	PIWI-argonaute-zwille

PACT	—	Proteinkinase R-activating Protein
PBS	—	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	—	Polymerase Chain Reaction
PDGF	—	Platelet Derived Growth Factor
PIWI	—	P-element Induced Wimpy Testis
POL	—	Polymerase
Pre-miRNA	—	Präkursor miRNA
Pri-miRNA	—	Primary miRNA
PTEN	—	Phosphatase And Tensin Homolog
qPCR	—	Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction
RIN	—	RNA Integrity Number
RISC	—	RNA-induced Silencing Complex
RNA	—	Ribonukleinsäure
ROC	—	Receiver Operating Characteristic-Kurven
RPMI	—	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	—	Reverse Transkriptase
TDG- $\alpha$	—	Thymin-DNA-Glykosidase- $\alpha$
TFE	—	Transcription Factor E
TGF $\beta$	—	Transforming Growth Factor $\beta$
TNM	—	Tumor Node Metastasis
TRBP	—	TAR RNA-binding Protein
VEGF	—	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	—	Von Hippel-Lindau
WHO	—	World Health Organization
WST	—	Water Soluble Tetrazolium

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 Nierenzellkarzinom	8
2.1.1 Epidemiologie	8
2.1.2 Ätiologie	9
2.1.3 Klassifikation der Nierenzellkarzinome	10
2.1.4 Makroskopie und Histologie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	11
2.1.5 Genetik des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	13
2.1.6 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad	14
2.1.7 Diagnostik und Therapie	17
2.2 MicroRNAs	22
2.2.1 Biogenese und Funktion der microRNA	23
2.2.2 Regulation der microRNA	25
2.2.3 Bedeutung in der Tumorgenese	27
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
4.1 Biologische Materialien	33
4.2 Geräte und Programme	36
4.3 Chemikalien und Kitsysteme	37
4.4 Gewebeaufarbeitung	38
4.5 RNA-Isolation	38
4.5.1 RNA-Isolierung mit Trizol	38
4.5.2 RNA-Isolierung mit Anreicherung der miRNA aus Geweben	39
4.5.3 Gesamt-RNA-Isolierung aus Geweben	40
4.5.4 Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellkulturen	40
4.6 RNA-Konzentrations- und Qualitätsmessung	41
4.7 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)	42
4.7.1 Reverse Transkription	42
4.7.2 Quantitative Realtime-PCR	43
4.8 Verwendung von SPSS	44
4.9 Zellkulturen	45
4.10 Transfektion	45
4.11 Proliferationsassay	47
4.12 Migrationsassay	47
4.13 Invasionsassay	48
4.14 Auswertung der Zellversuche	48
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
5.1 Vorversuche qPCR	49
5.2 qPCR-Validierung mit filterbasierender Isolierung der angereicherten miRNA	51
5.3 qPCR-Validierung von Gesamt-RNA nach der Trizolmethode	55
5.4 qPCR-Validierung von Gesamt-RNA-Isolierung mit filterbasiertem Kitsystem	56
5.5 Vergleich Gesamt-RNA mit filterbasiertem Kitsystem und angereicherter miRNA	56
5.6 Receiver Operating Characteristic-Kurven und Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für angereicherte miRNA	58
5.7 Funktionelle Analysen	63
5.7.1 Vorversuche Zellkultur	64
5.7.2 Konzentration Mimic und Inhibitor	65

5.7.3 Spezifität der Transfektion .....	67
5.7.4 Proliferation.....	67
5.7.5 Migration.....	69
5.7.6 Invasion .....	71
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>74</b>
6.1 Diskussion der qPCR-Ergebnisse.....	74
6.2 Diskussion der Methodik der RNA-Isolierung .....	80
6.3 Diskussion der funktionellen Analysen.....	82
<b>7. Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>85</b>
<b>8. Literatur- und Quellverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>95</b>
9.1 Ehrenwörtliche Erklärung .....	95
9.2 Danksagung .....	96

## 1. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist der dritthäufigste urologische Tumor. NZK sind eine heterogene Gruppe von Tumoren. Das klarzellige NZK, der Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit, ist mit etwa 75 % der häufigste Subtyp des NZK.

NZK machen ungefähr 3 % der Krebssterbefälle aus. Ein wesentlicher prognosebestimmender Faktor ist die Metastasierung. Die 5-Jahres-Überlebensrate sinkt bei Metastasierung von 70-90 % auf unter 10 %.

Micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) sind kleine, nicht-kodierende, einzelsträngige hochkonservierte RNA-Moleküle, welche eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese und der Metastasierung spielen. Für diverse Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass miRNA-Alterationen Einfluss sowohl auf das Metastasierungsgeschehen als auch auf die Prognose haben. Für das NZK existieren bisher hauptsächlich Studien, die die unterschiedliche miRNA-Expression in den verschiedenen Subtypen untersucht haben. Lediglich zwei Arbeiten konnten bisher eine veränderte, vorwiegend erniedrigte, miRNA-Expression in metastasierten NZK nachweisen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, miRNAs zu identifizieren, welche als prognostische Biomarker für die Metastasierung beim klarzelligen NZK geeignet sein könnten. Weiterhin sollten aggressive synchron metastasierte Tumoren von spät- und nicht metastasierten Tumoren differenziert werden. Dafür wurden aus vorangegangenen Microarrayuntersuchungen Kandidaten-miRNAs ausgewählt, deren Expressionsunterschiede mit der quantitativen Realtime-PCR (qPCR) validiert werden sollten. Im Anschluss daran sollte der Einfluss der ausgewählten miRNAs auf Proliferation, Migration und Invasion in Nierenzellkarzinomzelllinien untersucht werden.

Für die Analyse der miRNA-Expression wurden kryokonservierte Gewebeproben verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe von verschiedenen Verfahren. Hierbei handelte es sich um die Isolierung von Gesamt-RNA durch Trizol und die Isolierung von Gesamt-RNA und angereicherter miRNA durch ein filterbasiertes Kitsystem. Der Vergleich der miRNA-Expressionsanalysen der verschiedenen RNA-Isolationsmethoden mittels qPCR zeigte große Unterschiede. Die identifizierten Expressionsunterschiede der vorangegangenen Microarrayuntersuchungen, welche unter Verwendung angereicherter miRNAs durchgeführt wurden, konnten ausschließlich an dem Probenpool der angereicherten miRNA-Isolierung verifiziert werden. Bei der Untersuchung von Gesamt-RNA sowohl durch Trizolisolierung als auch durch eine filterbasierte Kitsystemisolierung konnten keine Expressionsunterschiede der

ausgewählten miRNAs festgestellt werden. Dies zieht als Schlussfolgerung nach sich, dass für eine Studie nur eine Isolierungsmethode verwendet werden sollte und keinesfalls Ergebnisse unterschiedlicher Isolierungsmethoden in einer Auswertung gemeinsam betrachtet werden sollten.

Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen synchron-, spät- und nicht metastasierten Tumoren konnten mit der Methode der angereicherten miRNA-Isolierung gezeigt werden. So sind die miRNAs let-7a, let-7b, let-7c, miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 in aggressiven synchron metastasierten Tumoren niedriger exprimiert als in spät- und nicht metastasierten Tumoren. Zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren können die miRNAs miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 unterscheiden, da sie in metastasierten Tumoren niedriger exprimiert sind.

In Hinblick auf die Prognose der Patienten wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Hierbei zeigte sich, dass eine erniedrigte Expression von let-7c mit einem verkürzten progressionsfreien-5-Jahresüberleben korreliert. Eine erniedrigte Expression von let-7a, let-7c, miR-26a, miR-30b und miR-30c korreliert mit einem verkürzten tumorspezifischen-5-Jahresüberleben.

Für die Zellkulturversuche wurde die Nierenzellkarzinomzelllinie 786-O verwendet und der Einfluss von let-7c untersucht. Die miRNA wurde unter Verwendung eines Transfektionsreagenz (Qiagen) in den Zellen inhibiert bzw. überexprimiert. Anschließend wurde das Verhalten der Zellen bezüglich Proliferation, Migration und Invasion untersucht. Die Zellen konnten erfolgreich transient transfiziert werden. Allerdings zeigte sich, dass bereits das Transfektionsreagenz das Verhalten der Zellen negativ beeinflusst. Somit konnten die funktionellen Analysen, bei denen als Kontrollgruppe unbehandelte Zellen verwendet wurden, die funktionelle Bedeutung der miRNA nicht abschließend klären. Die in dieser Arbeit erfolgte Etablierung der Zellversuche kann jedoch für weitere Studien als Grundlage dienen.

Die untersuchten miRNAs können als potentielle Prognosemarker für das metastasierte NZK fungieren und eine individuelle Einschätzung des Metastasierungspotentials am Primärtumor erlauben. Dadurch wird eine frühzeitige gezielte Therapie möglich und die Prognose des Patienten kann verbessert werden. Bereits in anderen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs in aggressiven Tumoren herunterreguliert sind. Die Bedeutung der miRNAs für das Metastasierungs geschehen ergibt sich weiterhin aus den bereits bekannten onkogenen Zielgenen.

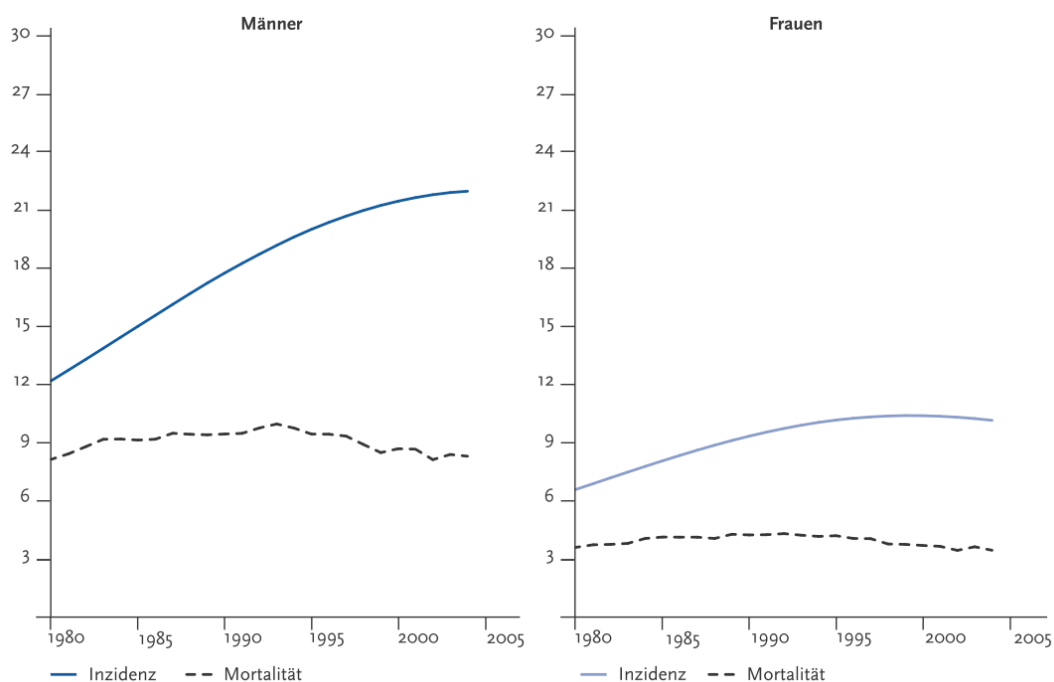


## 2. Einleitung

### 2.1 Nierenzellkarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie

An dritter Stelle der urologischen Tumoren steht in Deutschland das NZK. Die Neuerkrankungen beliefen sich in Deutschland im Jahr 2008 auf 8960 Fälle bei Männern und 5540 Fälle bei Frauen (Kaatsch et al. 2012). Männer sind somit wesentlich häufiger betroffen als Frauen. Das NZK tritt in Industrienationen häufiger auf als in Entwicklungsländern. In den letzten Jahren blieben die Inzidenz und die Mortalitätsrate des NZK auf konstantem Niveau (Abb. 1) (Eble et al. 2004; Kaatsch et al. 2012). Vor dem 30. Lebensjahr gibt es kaum Fälle von NZK. Ab dem 40. Lebensjahr steigt die Zahl der Erkrankungen kontinuierlich an und erreicht ihr Maximum zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr, danach kommt es wieder zu einem Abfall der Inzidenz (Kaatsch et al. 2012). Von allen Tumorerkrankungen macht das NZK etwa 4 % aller Fälle aus. Allerdings gehören die NZK zu den Tumoren, die am häufigsten zum Tod führen (Kaatsch et al. 2012).



**Abbildung 1:** Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität des NZK (Fälle pro 100.000) in Deutschland von 1980-2004 (Batzler et al. 2008).

### 2.1.2 Ätiologie

Die Entstehung des NZK ist nicht vollständig geklärt. In diversen Studien konnten allerdings bestimmte Umwelteinflüsse, Risikofaktoren und genetische Komponenten ausgemacht werden, die das Risiko für die Entstehung eines NZK erhöhen.

Sowohl für Männer als auch für Frauen erhöht sich das Risiko für NZK durch Rauchen (Setiawan et al. 2007). Je höher der Konsum an Zigaretten ist, desto höher ist auch das Erkrankungsrisiko (Yuan et al. 1998). Auch Passivrauchen begünstigt die Tumorentstehung (Theis et al. 2008).

Ein weiterer entscheidender Risikofaktor ist die Adipositas. Es konnte gezeigt werden, dass mit einem Anstieg des Body-Mass-Index auch die Zahl der NZK-Fälle zunimmt (Setiawan et al. 2007). Auch Bluthochdruck scheint ein entscheidender Risikofaktor zu sein (Chow et al. 2000).

Weitere Risikofaktoren sind die chronische Niereninsuffizienz (Risler et al. 2008), hoher Verbrauch von Analgetika (Gago-Dominguez et al. 1999) und die berufliche Exposition von bestimmten Stoffen, wie Cadmium, Blei, Asbest, chlorierten Lösungsmitteln und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Pesch et al. 2000).

Am häufigsten treten die NZK sporadisch auf, allerdings sind auch hereditäre Formen bekannt. Eine erbliche Komponente ist in der Ätiologie des NZK vorhanden, da Personen mit Verwandten ersten oder zweiten Grades, die an NZK erkrankt sind, ein erhöhtes Risiko haben, auch an diesem Tumor zu erkranken (Gago-Dominguez et al. 2001).

Weiterhin sind autosomal-dominante Erkrankungen bekannt, die mit einer NZK-Entstehung assoziiert sind. Beim von-Hippel-Lindau-Syndrom besteht ein 45%iges Risiko am klarzelligen NZK zu erkranken. Auch bei der tuberösen Sklerose besteht ein 10%iges Erkrankungsrisiko (Risler & Kühn 2008). Nicht mit Syndromen assoziiert ist die familiäre Häufung vom klarzelligen NZK, bei der es zu einem früheren Erkrankungsgipfel kommt, als dies bei sporadischem Auftreten der Fall ist (Woodward et al. 2000). Weitere hereditäre Formen sind beispielsweise das erbliche papilläre NZK, die hereditäre Leiomyomatose oder das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (Verine et al. 2010).

### 2.1.3 Klassifikation der Nierenzellkarzinome

Die Beschreibung des NZK begann 1884 durch Grawitz; er nahm an, dass die Neubildungen in der Niere durch versprengtes Nebennierengewebe hervorgerufen seien und bezeichnete diese als „Hypernephrome“.

Diese These wurde später widerlegt. 1960 zeigten Oberling et al. (Oberling et al. 1960) mit Hilfe des Elektronenmikroskops, dass die Tumoren epithelialen Ursprungs sind. Nach der Beschreibung diverser Untergruppen und weiterer elektronenmikroskopischer und histochemischer Untersuchungen wurde durch Thoenes et al. (Thoenes et al. 1986) eine Subklassifizierung vorgenommen. Die NZK wurden in der so genannten Mainz-Klassifikation in klarzellige, chromophile, chromophobe, onkozytäre, Ductus-Bellini-Karzinome und spindelzellige Untergruppen eingeteilt.

Die neueste Klassifizierung der NZK stammt aus dem Jahr 2004 und wurde durch die WHO (*World Health Organization*) vorgenommen. Hierbei wurden neben den histologischen Unterschieden auch molekulargenetische Veränderungen bei den Tumoren berücksichtigt. Nach der WHO-Klassifikation (Eble et al. 2004) unterscheidet man die häufig auftretenden klarzelligen, papillären und chromophoben NZK und die selteneren multilokulär zystischen NZK, Sammelrohrkarzinome, Nierenmarkkarzinome, NZK in Assoziation mit Xp11.2 Translokation/ *TFE (transcription factor E)-Fusion*, NZK in Assoziation mit Neuroblastom und weiterhin unklassifizierte NZK. Die Onkozytome stellen die einzige benigne Form der Nierentumoren dar.

In Tab. 1 sind die einzelnen Häufigkeiten der NZK dargestellt:

**Tabelle 1:** Einzelne Subtypen des NZK und ihre Häufigkeiten (Eble et al. 2004).

NZK	Häufigkeit
Klarzelliges NZK	75 %
Multilokuläres zystisches NZK	<1 %
Papilläres NZK	10 %
Chromophobes NZK	5 %
Sammelrohrkarzinom	<1 %
Nierenmarkkarzinom	Sehr selten (100 Fälle beschrieben)
NZK in Assoziation mit Xp11.2 Translokation/ TFE-Fusion	<1 %
NZK in Assoziation mit Neuroblastom	Sehr selten (18 Fälle beschrieben)
Muzinös-tubuläres und spindelzelliges Karzinom	<1 %
Unklassifizierte NZK	4-5 %

### 2.1.4 Makroskopie und Histologie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Das klarzellige NZK ist mit 75 % der häufigste Subtyp dieses Tumors und Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Klarzellige NZK sind meist an den distalen Nierenpolen lokalisiert. Die Schnittfläche des zumeist soliden, unilateralen Tumors erscheint meist gelb, bedingt durch den Lipidreichtum. Teilweise zeigen sich aber auch graue oder weiße Areale, die weniger differenzierten Bereichen entsprechen. Selten sind zystische Strukturen vorhanden. Das Karzinom kann nekrotische oder kalzifizierte Bereiche aufweisen und hämorrhagisch durchsetzt sein (Abb. 2). Häufig sind die Tumoren von einer Pseudokapsel umgeben, können jedoch auch in Gefäße, das Nierenbecken oder das umliegende Fettgewebe einbrechen (Diaz et al. 1999; Schaps et al. 2008; Störkel 1999).

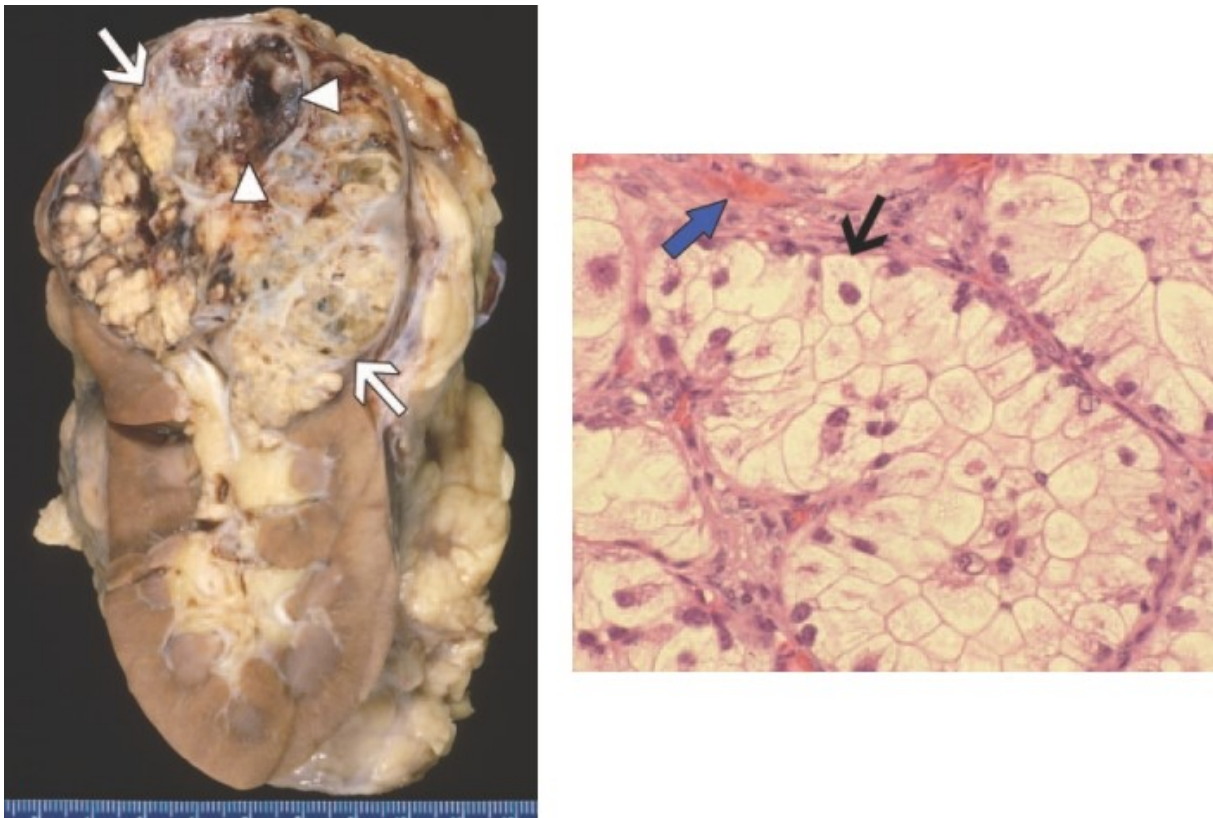
Das klarzellige NZK entsteht aus dem proximalen Tubulusepithel (Pars convoluta); dementsprechend zeigen sich histologisch Korrelate wie z.B. Bürstensaumepithelien. Intrazellulär finden sich viel Glykogen und viele Lipide, die während der histologischen Aufarbeitung gelöst werden, so dass sich das Zytoplasma mikroskopisch meist klar und leer darstellt (Abb. 2). In nekrotischen und hämorrhagischen Bereichen befindet sich hingegen auch eosinophiles Zytoplasma.

Das Gewebe stellt sich meist solide, alveolär oder azinär dar, seltener sind tubuläre oder zystische Formen vorhanden. Durch das Gewebe ziehen geordnete Netzwerke kleiner

dünnwandiger Blutgefäße. Die zumeist zentral gelegenen Zellkerne sind gleichförmig und enthalten feingranuläres Chromatin. Entzündungsinfiltrate sind in den histologischen Darstellungen kaum vorhanden (Diaz et al. 1999; Hammerschmied et al. 2008; Prasad et al.; Störkel 1999).

Im Gegensatz dazu findet sich bei der zweithäufigsten Form des NZK, dem papillären NZK, ein vorherrschendes papilläres Wachstumsmuster mit teilweise tubulären Strukturen. Im papillären Stroma finden sich Anhäufungen von Makrophagen und Cholesterinkristallen. Es werden weiterhin die Typ-1 papillären NZK mit Monolayern von blassen Zellen und die Typ-2 papillären NZK mit großen eosinophilen Zellen unterschieden.

Chromophobe NZK, die dritthäufigsten NZK, besitzen große polygonale Zellen, welche mit hellem retikulären oder eosinophilem granulären Zytoplasma gefüllt sind. Typisch für diesen Subtyp des NZK sind dickwandige, oftmals hyalinisierte Blutgefäße. Somit ist eine Unterteilung der häufigsten NZK-Subtypen anhand der Histologie möglich (Hammerschmied et al. 2008; Prasad et al.).



**Abbildung 2:** Linke Seite: Makroskopische Darstellung des klarzelligen NZK (Pfeile zeigen knotiges Wachstum, Pfeilspitzen zeigen Hämorrhagien und Nekrosen). Rechte Seite: Histologische Darstellung des klarzelligen NZK (Schwarzer Pfeil zeigt die namensgebenden klaren Zellen, blauer Pfeil zeigt auf die prominente Vaskularisation) (Prasad et al.).

### 2.1.5 Genetik des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Neben den sichtbaren makroskopischen und histologischen Veränderungen beim klarzelligen NZK gibt es auch bestimmte molekulare Charakteristika.

Verschiedene Studien zeigten, dass es auf der Chromosomenebene repräsentative Verluste und Zugewinne von DNA (Desoxyribonukleinsäure) gibt. DNA-Verluste zeigten sich in den Regionen von 3p, 6q, 8p, 9 und 14q. Zugewinne waren auf den Regionen 7q22 und 8q zu verzeichnen (Cairns 2010; Junker et al. 2003). Die prozentual größte Veränderung ist der Verlust der 3p-Region in etwa 90 % der Fälle. Dieser Verlust gehört zu den frühzeitigen genetischen Veränderungen. Ein Verlust der Genregionen 8p, 9p und 14q ist assoziiert mit einem fortgeschrittenem Stadium des klarzelligen NZK (Cairns 2010).

Chromosomale Verluste befinden sich oft in Regionen von Tumorsuppressorgenen. Es konnte beispielsweise für das Chromosom 3 gezeigt werden, dass sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms das VHL (von Hippel-Lindau)-Gen, ein Tumorsuppressorgen, befindet (Seizinger et al. 1988). Das VHL-Gen kodiert das VHL-Protein; dieses dient unter normoxischen Zuständen dem Abbau des Transkriptionsfaktors HIF (Hypoxie induzierter Faktor)- $\alpha$ , der wiederum die Bildung von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und Erythropoetin stimuliert. Somit kommt es bei einer Mutation des Gens und einem gleichzeitigen Verlust der zweiten Kopie auf dem anderen Chromosom zu einer verstärkten Produktion von Wachstumsfaktoren und einer übermäßigen Angiogenese (Kim et al. 2004). Bei 90 % der sporadisch entstehenden klarzelligen NZK konnte eine LOH (*Loss of Heterozygosity*) für das VHL-Gen nachgewiesen werden. Der Verlust der 3p-Region ist einer der ersten und wichtigsten Schritte in der Entstehung des klarzelligen NZK, aber ist allein nicht ausreichend für eine Tumorentstehung (Kondo et al. 2002).

Auch die anderen Subtypen des NZK zeigen spezifische chromosomale Veränderungen. So gibt es beim papillären NZK häufig einen Zugewinn der Chromosomen 7 und 17 und einen Verlust des Y-Chromosoms. Chromophobe NZK weisen Verluste der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 auf. Beim Onkozytom findet sich häufig ein Verlust von Chromosom 1 (Cairns 2010; Junker et al. 2009).

### **2.1.6 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad**

Das TNM (*Tumor-Node-Metastasis*)-System wurde für die Klassifizierung maligner Tumoren entwickelt. Hierbei werden die Ausdehnung des Primärtumors, das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und das Vorhandensein von Fernmetastasen beurteilt.

Die Einteilung beim NZK ist aus der Tab. 2 nach Wittekind et al. ersichtlich (Wittekind 2010). Für die Beurteilung der regionalen Lymphknoten werden die unilateralen hilären, abdominalen paraaortalen, interaortokavalen und paracavalen Lymphknoten begutachtet.

**Tabelle 2:** TNM-Klassifikation des NZK (Wittekind 2010).

<b>Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 7,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor 4,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 4,0 cm, aber nicht mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2a	Tumor mehr als 7,0 cm, aber nicht mehr als 10,0 cm in größter Ausdehnung
T2b	Tumor mehr als 10,0 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava (einschließlich Wandbefall) unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V.cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
<b>Regionäre Lymphknoten</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
<b>Fernmetastasen</b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen



NZK metastasieren vorwiegend hämatogen und seltener lymphogen. Die Organe, die am häufigsten von einer Fernmetastasierung betroffen sind, sind Lunge (55 %), Leber (33 %), Knochen (32 %), kontralaterale Niere (11 %) und Zentrales Nervensystem (5 %) (Risler & Kühn 2008).

Wie bei jedem Tumor ist auch beim NZK die genaue Beurteilung des Tumors wichtig für die Prognosebewertung und für die Therapieentscheidung. Nach der „*International Union Against Cancer*“ wird das NZK, auf Grundlage der TNM-Klassifikation, in verschiedene Stadien eingeteilt. Abhängig von diesen Stadien ergibt sich die Prognosebewertung für den Patienten (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Stadieneinteilung des NZK und die dazugehörige Prognose (Fischer et al. 2008).

Stadium	TNM-Klassifikation			Prognose (5-Jahres-Überlebensrate)
Stadium I	T1	N0	M0	70-90 %
Stadium II	T2	N0	M0	50-60 %
Stadium III	T1	N1	M0	20-30 %
	T2	N1	M0	20-30 %
	T3	N0	M0	30-50 %
	T3	N1	M0	10-20 %
Stadium IV	T4	N0, N1	M0	0-10 %
	Jedes T	N2	M0	
	Jedes T	Jedes N	M1	

Weiterhin kommt zur Einteilung des Malignitätsgrades des NZK das histopathologische Grading nach Fuhrmann zum Einsatz, bei dem die Kerngröße, die Kernform, das Chromatin und die Nukleolen beurteilt werden. Hierbei werden fünf Gradingstufen unterteilt. G1 sind gut differenzierte Tumoren, G2 mäßig differenzierte Tumoren und G3 und 4 schlecht differenzierte bzw. undifferenzierte Tumoren. Weiterhin gibt es die Einteilung GX, bei der der Differenzierungsgrad des Gewebes nicht beurteilt werden kann (Fuhrman et al. 1982).

### 2.1.7 Diagnostik und Therapie

Die früher beschriebene Symptomtrias aus Hämaturie, Flankenschmerzen und palpablem Tumor treten heute nur noch in etwa 15 % der Fälle auf und sind außerdem ein Zeichen für einen weit fortgeschrittenen Tumor. Mehr als die Hälfte aller NZK sind zu Beginn symptomlos und werden heute bei Routinebildgebungsuntersuchungen zufällig entdeckt (Kane et al. 2008).

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose leiden 20 % der Patienten an paraneoplastischen Symptomen, im Verlauf der Erkrankung sind es immerhin bis zu 40 % der Patienten. Zu den paraneoplastischen Symptomen beim NZK zählen Hyperkalziämie, Hypertonie, ektope Hormonproduktion, Anämie, hepatische Dysfunktion (Stauffer-Syndrom), neurologische und dermatologische Paraneoplasien. B-Symptomatik wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Leistungsknick treten häufig erst in fortgeschrittenen Stadien des NZK auf (Bedke et al. 2007).

In der Sonographie sind die Raumforderungen zumeist glatt begrenzt und überschreiten die eigentliche Nierenkontur. Die Echogenität stellt sich sehr verschieden dar; sie reicht von echoarm bis echoreich, teilweise echogleich mit dem Nierenparenchym. Weiterhin können kalzifizierte, hämorrhagische, nekrotische und zystische Areale dargestellt werden (Abb. 3) (Schaefer-Prokop 1998a).

Als weitere sichernde, bildgebende Untersuchung ist die Computertomographie (CT) mit i.v. Kontrastmittel das Verfahren der ersten Wahl (Abb. 3). Stark vaskularisierte Tumoren nehmen das Kontrastmittel in hohem Maße auf im Gegensatz zu Zysten. Bei Kontraindikation, zum Beispiel Kontrastmittelunverträglichkeit, gegen das CT kann auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit Angiographie durchgeführt werden. Bei diesen beiden Untersuchungen erhält man neben Information über den Tumor auch Informationen darüber, ob venöse Tumorthromben oder vergrößerte Lymphknoten vorhanden sind (Schaefer-Prokop 1998a).



**Abbildung 3:** Linke Seite: Sonographische Darstellung eines echoarmen NZK im oberen rechten Nierenpol (Schaefer-Prokop 1998b). Rechte Seite: Computertomographische Darstellung eines kleinen Karzinoms der rechten Niere (Schaps et al. 2008).

Bei einem Screening nach Fernmetastasen werden Röntgenthorax, bei neurologischen Symptomen ein MRT des Gehirns und gegebenenfalls auch nuklearmedizinische Untersuchungen durchgeführt (Schaps et al. 2008).

In der klinischen Labordiagnostik gibt es weder im Urin noch im Blut spezifische Marker für das NZK. Es wird jedoch eine Untersuchung des Urins durchgeführt, um z.B. eine Hämaturie nachzuweisen. Weiterhin gibt es im Serum unspezifisch veränderte Werte, wie BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit)-Erhöhung, Hyperkalzämie, Anämie, Leberwert-erhöhungen, die allerdings meist für ein fortgeschrittenes Stadium des NZK sprechen (Kath 2005).

Eine perkutane Tumorbiopsie kann bei kleinen, klinisch nicht auffälligen Tumoren sinnvoll sein, um die Malignität des Tumors abzuklären. Die Biopsie ergibt in 70-90 % der Fälle akkurate Ergebnisse und dies bei geringen Komplikationsraten (Remzi et al. 2009). Eine letztendliche Sicherung des Befundes wird nach einer operativen Entfernung des Tumors mit Hilfe einer histologischen Aufarbeitung durchgeführt.

Differentialdiagnostisch sind klarzellige NZK von Nierenzysten, benignen soliden Nierentumoren wie Angiomyolipom, Onkozytom, von Lymphomen und Metastasen von anderen malignen Tumoren wie Bronchialkarzinom abzugrenzen (Schaefer-Prokop 1998a).

Bei der Therapie des NZK muss differenziert werden zwischen Behandlung eines lokalen Tumors und der eines metastasierenden Tumors.

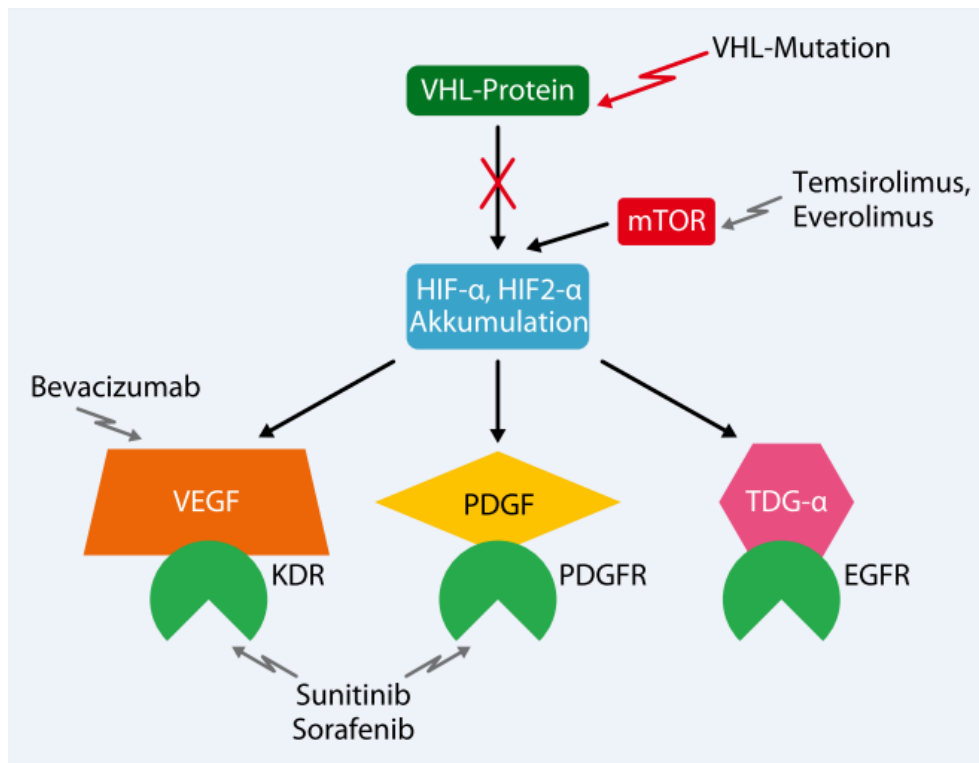
Die chirurgische Therapie des NZK kann als organerhaltende Nierentumorsektion oder als radikale Tumor-Nephrektomie erfolgen. Nach der europäischen Leitlinie zur Behandlung des NZK (2010) gibt es drei Indikationen für den Einsatz einer organerhaltenden Therapie. Absolute Indikationen sind das anatomisch oder funktionell bedingte Vorhandensein nur einer Niere, relative Indikationen sind Erkrankungen der kontralateralen Niere, die in der Zukunft zu einer Niereninsuffizienz führen könnten und bei der elektiven Indikation handelt es sich um kleine lokale Tumoren bei gesunder Gegenniere (Ljungberg et al. 2010). Für Tumoren mit einem niedrigen Tumorstadium ist eine organerhaltende Tumorsektion einer totalen Nephrektomie vorzuziehen (Delakas et al. 2002). Bei größeren Tumoren und solchen, die aufgrund ihrer Lokalisation nicht organerhaltend operiert werden können oder bereits in Lymphknoten metastasiert sind, muss eine radikale Tumor-Nephrektomie durchgeführt werden. Die Operationen können entweder offen auf verschiedenen Zugangswegen oder laparoskopisch durchgeführt werden.

Für kleine Tumoren stehen ablativ Verfahren, die Kryotherapie und die Radiofrequenztherapie zur Verfügung, die jedoch keine Standardtherapien darstellen.

Für gleichzeitig auftretende Metastasen wird nach der europäischen Leitlinie zur Behandlung des NZK bei rezidierbaren Metastasen und einem guten Allgemeinzustand des Patienten eine chirurgische Entfernung der Metastasen empfohlen (Ljungberg et al. 2010). Die Entfernung der Metastasen verbessert die Überlebensprognose des Patienten (van der Poel et al. 1999). Auch bei Hirn- und Knochenmetastasen kann unter bestimmten Gegebenheiten eine palliativ-symptomatische Bestrahlung durchgeführt werden, das NZK selbst ist allerdings nicht strahlensensibel.

Beim metastasierten NZK besteht weiterhin die Indikation für die systemische Therapie (Michael 2007). Die Chemotherapie entfällt als Therapieoption, da das NZK weitestgehend als resistent gilt, unter anderem aufgrund der Multidrugresistenz (Hartmann et al. 1999). Bis vor einigen Jahren war die Immuntherapie die einzig mögliche systemische Therapie. Hierfür wurden Interferon- $\alpha$  und Interleukin-2 verwendet. In einer Cochrane-Studie konnte gezeigt werden, dass Interferon- $\alpha$  das mittlere Überleben auf 3,8 Monate erhöht und die Einjahresmortalität um 44 % senkt. Für eine Hochdosis-Interleukin-2-Therapie konnte eine sichere Steigerung des Überlebens nicht gezeigt werden (Coppin 2008). Die als Hannover-Schema bekannte Kombination aus Interferon- $\alpha$ , Interleukin-2 und 5-Fluorouracil zeigt keinen Vorteil gegenüber einer alleinigen Interferon- $\alpha$ -Therapie (Gore et al. 2010).

Aufgrund des besseren Verständnisses der Signalkaskaden des NZK wurden in den letzten Jahren Therapeutika entwickelt, die gezielt in diese Signalkaskaden eingreifen. Alle sogenannten „*targeted therapeutica*“ für das NZK blockieren den VHL-HIF $\alpha$ -Signalweg, der bereits beschrieben wurde (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Darstellung des VHL-HIF $\alpha$ -Signalweges und der Angriffsstellen der „*targeted therapeutica*“ (VHL: Von-Hippel-Lindau, HIF: hypoxieinduzierbarer Faktor, mTOR: *mammalian target of rapamycin*, VEGF: *vascular epithelial growth factor*, PDGF: *platelet derived growth factor*, TDG- $\alpha$ : Thymin-DNA-Glykosidase- $\alpha$ , EGFR: *epidermal growth factor receptor*, KDR: *kinase insert domain receptor*) (Schenck et al. 2010).

Zu den zielgerichteten Therapeutika gehören derzeit Bevacicumab (Avastin®), Sunitinib (Sutent®), Sorafenib (Nexavar®), Axitinib, Pazopanib (Votrient®), Temsirolimus (Torisel®) und Everolimus (Afinitor®).

Bevacicumab ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, der an VEGF bindet und dadurch die Angiogenese und das Tumorwachstum hemmt. In der so genannten AVOREN-Studie konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab in Kombination mit Interferon- $\alpha$  im Gegensatz zu einer alleinigen Interferon- $\alpha$ -Therapie das progressionsfreie Überleben verlängert (10,2 Monate vs 5,4 Monate). Hierbei werden als häufigste Nebenwirkungen Hypertension, Anorexie, Fatigue und Asthenie beschrieben (Escudier et al. 2007).

Sunitinib, Sorafenib, Axitinib und Pazopanib gehören zu den Multikinase-Inhibitoren. Dies bedeutet, dass sie mehrere Rezeptortyrosinkinasen gleichzeitig hemmen können. Im Fall von

Sunitinib sind dies beispielsweise die Rezeptortyrosinkinasen VEGF, PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), Tyrosinkinase KIT und FMS-like Tyrosinkinase3, die entscheidend für Angiogenese und Tumorwachstum sind. Für die Multikinase-Inhibitoren konnte ein Therapievorteil für die einzelnen Substanzen im Gegensatz zu alleiniger Interferon- $\alpha$ -Therapie aufgezeigt werden. Beispielhaft erhöht sich das progressionsfreie Überleben bei einer Sunitinibtherapie auf 11 Monate gegenüber 5 Monaten bei einer alleinigen Interferon- $\alpha$ -Therapie. Für Sunitinib werden als häufigste Nebenwirkungen Hypertension, Fatigue, Diarrhoe und Hand-Fuß-Syndrom angegeben (Motzer et al. 2007). Die anderen Multikinase-Inhibitoren besitzen ähnliche Nebenwirkungen.

Weitere „*targeted therapeutics*“ sind die m-TOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*)-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus. M-TOR ist ein zentraler Sensor und Motor der Zelle, der einen wesentlichen Regulationsschnittpunkt in verschiedenen Signalkaskaden darstellt. Diese Signalkaskaden sind entscheidend für Zellwachstum, Angiogenese und Apoptose. Für Temsirolimus konnte in einer Phase-III-Studie ein Überlebensvorteil gegenüber alleiniger Interferon- $\alpha$ -Therapie von 10,9 gegenüber 7,3 Monaten gezeigt werden. Die häufigsten Nebenwirkungen, die für Temsirolimus bekannt sind, bestehen in Anämie, Asthenie, Infektionen und Dyspnoe (Hudes et al. 2007).

Welche Therapie ein Patient mit metastasiertem NZK erhält, richtet sich in erster Linie nach der Prognose des Patienten. Die Prognose kann nach den Motzer-Kriterien in „*Low risk*“ (keine Risikofaktoren), „*Intermediate risk*“ (1-2 Risikofaktoren) und „*High risk*“ (>3 Risikofaktoren) eingeteilt werden (Tab. 4). Zu den Motzer-Kriterien gehören ein Karnofsky-Index <80 %, hohe Laktatdehydrogenase (>1,5fach), niedriges Hämoglobin, hohes Serumkalzium (>10mg/dl) und der Zeitraum zwischen Diagnose und Therapie (<1Jahr) (Motzer et al. 1999).

**Tabelle 4:** Empfohlene Therapie des NZK in Abhängigkeit des Risikos und der vorhergehenden Therapie (Ljungberg et al. 2010).

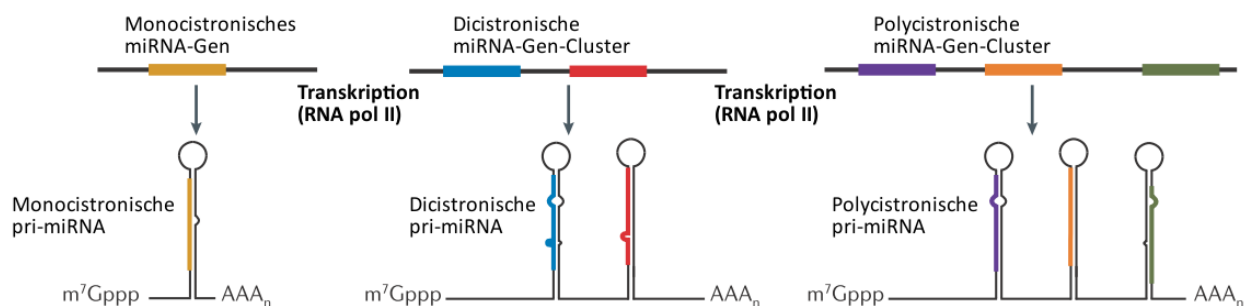
Therapie	Risiko/ vorhergehende Therapie	Empfohlenes Medikament
<i>1st-line</i>	„ <i>Low risk</i> “ oder „ <i>Intermediate risk</i> “	Sunitinib
		Bevacizumab+IFN- $\alpha$
		Pazopanib
	„ <i>High risk</i> “	Temsirolimus
<i>2nd-line</i>	Vorhergehende Therapie mit Zytokinen	Sorafenib
		Pazopanib
	Vorhergehende Therapie mit VEGF-Inhibitoren	Everolimus
	Vorhergehende Therapie mit mTOR-Inhibitoren	Klinische Studien

## 2.2 MicroRNAs

MiRNAs sind etwa 22nt lange, nicht-kodierende, einzelsträngige hochkonservierte RNA-Moleküle, welche eine wesentliche Rolle bei der posttranskriptionalen Genregulation spielen. MiRNAs sind gewebe- und entwicklungsspezifische RNA-Moleküle. Das erste Mal wurden 1993 in *Caenorhabditis elegans* kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle beschrieben, welche durch eine antisense RNA-RNA Interaktion eine Herunterregulierung eines Gens bewirken (Lee et al. 1993). Seitdem wurden auch in vielen anderen Organismen miRNAs entdeckt und man geht davon aus, dass alle Organismen miRNAs besitzen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden etwa 2000 humane miRNAs identifiziert (miRBase Oktober 2012). MiRNAs regulieren mindestens 30 % aller proteincodierenden Gene von Säugetieren und beeinflussen somit die meisten biologischen Prozesse (Lewis et al. 2005).

### 2.2.1 Biogenese und Funktion der microRNA

Von der Transkription der miRNA bis zur Entstehung der reifen miRNA liegen mehrere Zwischenschritte, die als Biogenese der miRNA bezeichnet werden. MiRNA-Genloci liegen auf Introns oder Exons kodierender Gene oder außerhalb von Genen (Rodriguez et al. 2004). Genabschnitte werden entweder durch die RNA-Polymerase II (POL II) transkribiert oder in proteincodierenden Genabschnitten durch die RNA-Polymerase III (POL III) abgelesen. Dabei können einzelne monocistronische miRNAs abgelesen werden oder, wenn mehrere miRNAs in einer Transkriptionsregion hintereinander liegen, können diese di- oder polycistronische miRNAs transkribiert werden (Abb. 5).

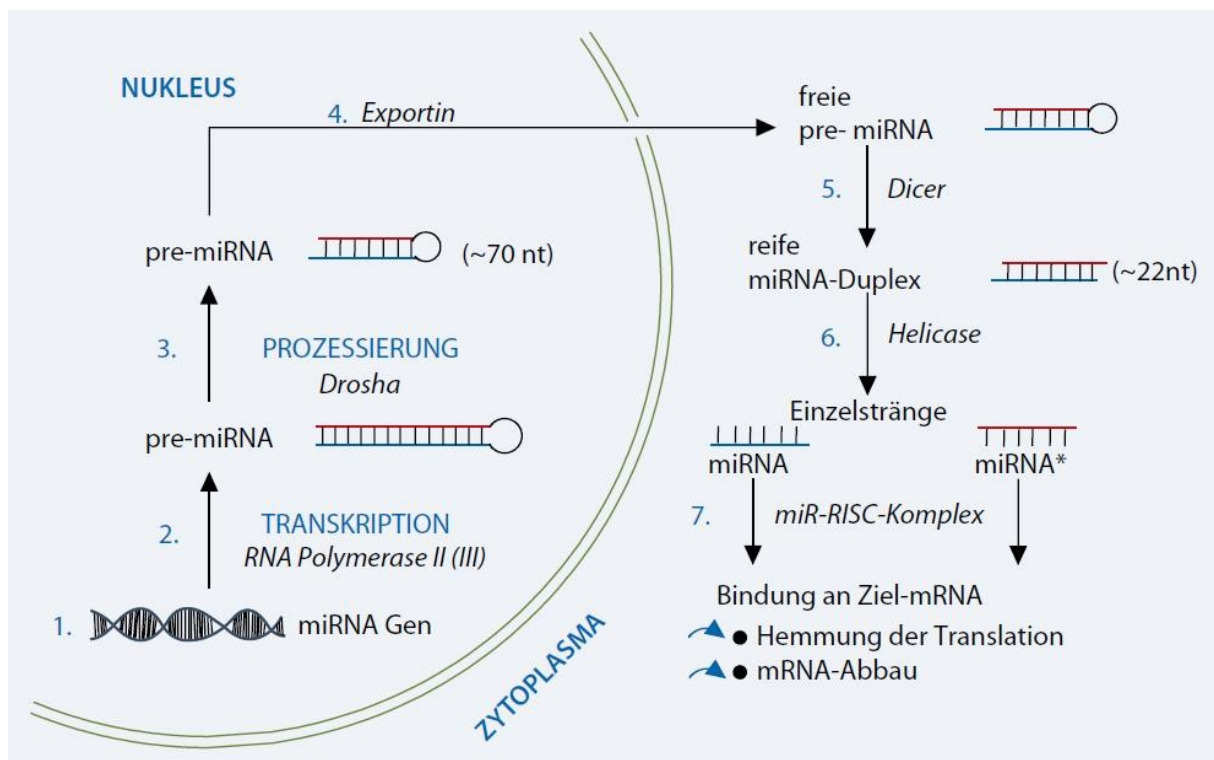


**Abbildung 5:** Entstehungswege der primary-miRNA von monocistronischen, dicistronischen oder polycistronischen Genen (Sarnow et al. 2006).

Dadurch entstehen sogenannte primary-miRNA (pri-miRNA), welche mehrere Kilobasen lang sind, eine Haarnadelstruktur bilden und Polyadenylierung sowie 5'-CAP-Strukturen besitzen (Lee et al. 2004). Nachfolgend kommt es zur Reifung der miRNA. Im ersten Schritt wird ein Teil der Haarnadelstruktur abgespalten, so dass eine 70 Nukleotide (nt) lange Präkursor-miRNA (pre-miRNA) entsteht. Diese Spaltung geschieht im Zellkern durch eine RNase III, welche als Drosha bezeichnet wird, gemeinsam mit deren Cofaktor Pasha (DGCR8) (Han et al. 2004; Lee et al. 2003). Drosha und deren Cofaktoren werden als Mikroprozessor-Komplex bezeichnet. Anschließend wird die pre-miRNA durch Exportin5 aus dem Zellkern geschleust (Lund et al. 2004). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA ebenfalls durch eine RNase III, welche als Dicer bezeichnet wird und den dazugehörigen Cofaktoren *TAR RNA-binding protein* (TRBP) und *Proteinkinase R-activating protein* (PACT) weiter gespalten. Die terminale Haarnadelschleife wird abgetrennt, so dass ein 20-25bp langer miRNA-Duplex vorliegt (Knight et al. 2001). Der thermodynamisch stabilere Strang, die reife miRNA, wird an ein Argonautprotein (Ago-Protein) gebunden und bildet mit weiteren Cofaktoren den *RNA-induced silencing complex* (RISC-Komplex), der andere Strang



wird abgebaut. Das Ago-Protein ist ein wesentlicher Teil des RISC-Komplexes. Im Menschen werden acht Ago-Proteine exprimiert, wobei diese nochmals in eine Ago- und eine Piwi-Untergruppe unterteilt werden. Zur eigentlichen humanen Ago-Subfamilie gehören vier Ago-Proteine. Diese Proteine sind hochkonserviert und besitzen drei wesentliche Domänen, die *P-element induced wimpy testis* (PIWI), *PIWI-argonaute-zwille* (PAZ)- und MID-Domäne. An der PAZ-Domäne bindet das 3'Ende des reifen miRNA-Strangs. Das 5'Ende bindet an der MID-Domäne. Die PIWI-Domäne besitzt eine Endonukleaseaktivität, allerdings nur bei dem Ago-Protein 2 (Maniataki et al. 2005; Peters et al. 2007). Das 5'-Ende der miRNA bindet an den 3'-nichttranslatierten Bereich der Ziel-Messenger RNA (Ziel-mRNA). Um an die Ziel-mRNA zu binden, ist hierbei insbesondere die sogenannte „seed-Region“ entscheidend. Die Nukleotide 2-8 müssen vollständig komplementär zu denen der Ziel-mRNA sein, damit die miRNA mit dem RISC-Komplex binden und eine Interaktion stattfinden kann (Abb. 6) (Lewis et al. 2003).

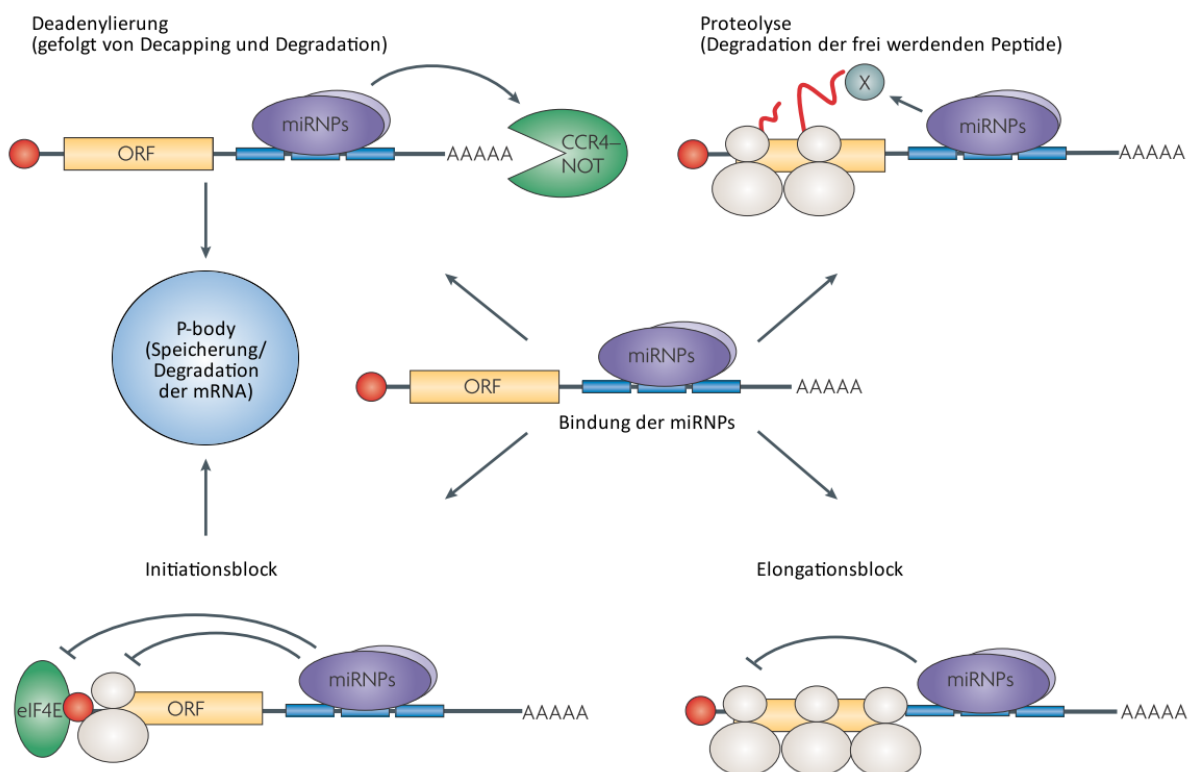


**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der miRNA-Biogenese (Schaefer et al. 2009).

Bei vollständiger Komplementarität zwischen miRNA und mRNA erfolgt der Abbau der mRNA durch die Endonukleaseaktivität der PIWI-Domäne des Ago-Proteins, welche deshalb auch als Slicer bezeichnet wird. Wenn keine vollständige Komplementarität vorliegt, wird die Translation der mRNA unterdrückt (Hutvagner et al. 2002). Durch diesen Mechanismus kann

eine miRNA mehrere mRNAs in ihrer Translation beeinflussen; eine mRNA kann auch von verschiedenen miRNAs reguliert werden.

Die Translation kann durch unterschiedliche Mechanismen gehemmt werden. Ein wesentlicher Mechanismus ist die Unterdrückung der Initiation der mRNA-Translation. Hierbei wird durch den RISC-Komplex verhindert, dass die Untereinheiten der Ribosomen an die mRNA binden können. Weiterhin wird durch das Binden der miRNA die Elongation verlangsamt. Kontrovers diskutiert wird, ob die miRNAs ebenfalls eine Degradation der entstandenen Polypeptide bewirken (Abb. 7) (Filipowicz et al. 2008). Auch können miRNAs die Transkription unterdrücken, indem sie Chromatinstrukturen verändern. Dies geschieht infolge von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung (Hawkins et al. 2008).



**Abbildung 7:** Darstellung möglicher Mechanismen der Translationshemmung durch miRNA (miRNPs beschreibt den miRNA-Protein-Komplex) durch Abbau der mRNA (oben links), durch Hemmung des Beginns der Translation (unten links), Hemmung der Elongation (unten rechts) oder durch Abbau des gebildeten Polypeptids (oben rechts) (Filipowicz et al. 2008).

## 2.2.2 Regulation der microRNA

Eine Regulation der miRNA-Expression ist bereits auf genetischer Ebene in Form von Deletion oder Amplifikation der miRNA-Loci möglich. Dies wird in Hinblick auf die

Tumorgenese im folgenden Kapitel besprochen. Die Regulation der miRNA kann weiterhin bei jedem Schritt der Biogenese, von der Transkription bis zum Abbau der miRNA, erfolgen. Die miRNA wird teilweise gemeinsam mit den Protein-codierenden Genen transkribiert und koreguliert, auf deren Introns oder Exons sie sich befindet, teilweise erfolgt die Regulation der Transkription allerdings auch unabhängig von diesen „*Host-Promotoren*“ durch eigene Promotoren. MiRNAs, deren Genloci auf nicht-proteincodierenden Genen liegen, besitzen ebenfalls eigenständige Promotoren. Die Transkription der miRNA wird über ähnliche Promotoren reguliert, wie dies bei proteincodierenden Genen der Fall ist. Die Promotoren besitzen unter anderem CPG-Inseln, TATA-Box-Sequenzen und werden durch Transkriptionsfaktoren reguliert (Ozsolak et al. 2008).

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Regulation der miRNA ist der Mikroprozessor, bestehend aus Drosha, DGCR8 und weiteren Hilfsproteinen. Bei einer Fehlregulation der einzelnen Komponenten kommt es zu einem veränderten miRNA-Expressionsmuster. Beispielshaft seien die entscheidenden Hilfsproteine DEAD-box RNA-Helikasen p68 und p72 genannt. Es konnte gezeigt werden, dass deren Inhibition in Mäusen dazu führt, dass ein Teil der miRNAs herunterreguliert wird (Fukuda et al. 2007). Diese RNA-Helikasen wiederum interagieren mit verschiedenen Proteinen, wie SMAD, p53 oder dem Estrogen-Rezeptor  $\alpha$ . Auf der Ebene des Mikroprozessors gibt es demzufolge bereits eine Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten für Regulationsmechanismen (Davis et al. 2009).

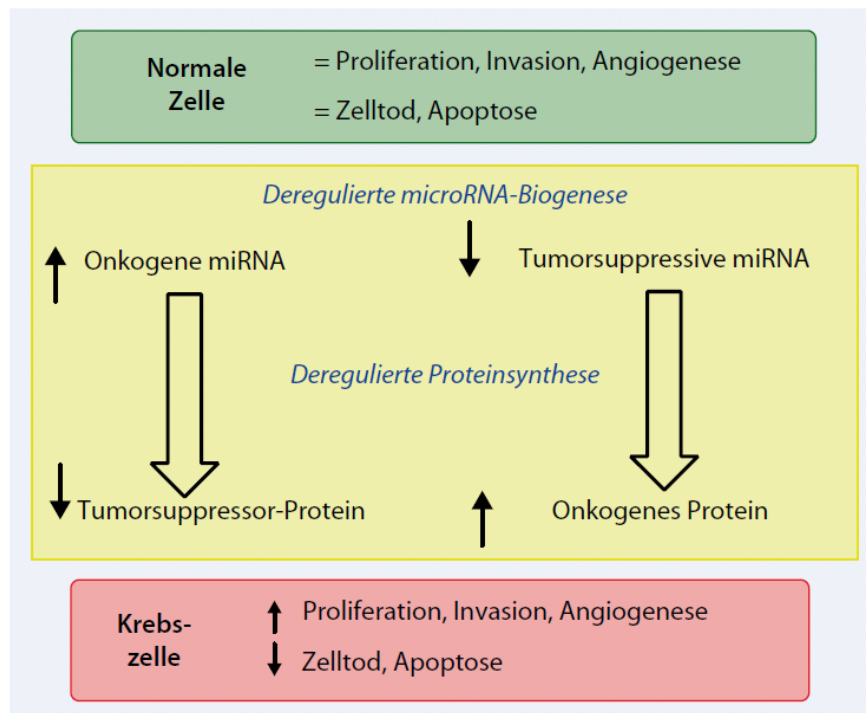
Im darauf folgenden Schritt der Biogenese, der Entstehung der reifen miRNA durch die RNase Dicer, greifen weitere Regulationsmechanismen an. Der Dicer-Komplex ist in diversen Karzinomen hoch- bzw. herunterreguliert. Wenn die Cofaktoren TRBP und PACT in geringer Konzentration vorliegen, wird die Aktivität von Dicer reduziert. Dementsprechend ändert sich auch die Menge der vorliegenden reifen miRNA (Davis & Hata 2009).

Die Ago-Proteine spielen für den RISC-Komplex eine entscheidende Rolle. Sind diese Proteine vermehrt vorhanden, kommt es gleichzeitig zu einer Erhöhung reifer miRNA. Hingegen ist weniger reife miRNA vorhanden, wenn insbesondere das Ago2-Protein in geringerer Menge zur Verfügung steht (Diederichs et al. 2007).

Über den Abbau und die Stabilität von miRNAs ist bisher, im Gegensatz zu den diversen anderen Regulationsmechanismen, relativ wenig bekannt. Die meisten miRNAs scheinen sehr stabil zu sein. Es sind allerdings auch miRNAs bekannt, die durch einen schnellen Abbau gekennzeichnet sind (Bail et al. 2010). Für den Abbau der miRNAs sind Exoribonukleasen verantwortlich (Chatterjee et al. 2009).

### 2.2.3 Bedeutung in der Tumorgenese

Wenn davon auszugehen ist, dass miRNAs etwa 30 % der proteinkodierenden Gene beeinflussen, dann liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sich unter diesen Genen auch solche befinden, die eine Rolle bei der Tumorgenese spielen. MiRNAs regulieren biologische Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Diese Prozesse spielen bei der Entstehung eines Tumors eine wesentliche Rolle. MiRNAs können entweder onkogene oder tumorsuppressive Wirkung besitzen, je nachdem, welche mRNAs durch sie reguliert werden. Tumorsuppressive miRNAs beispielsweise, die in Tumoren herunterreguliert sind, können die mRNA für onkogene Proteine nicht mehr inhibieren und in diesem Fall wird die Tumorgenese begünstigt (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Übersicht über deregulierte miRNA-Biogenese und deren Auswirkung auf die Tumorgenese. (Schaefer & Jung 2009)

Im vorangegangenen Kapitel wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, über die die Biogenese der miRNA reguliert werden kann. Diese Regulation kann in Krebszellen verändert sein, so dass vermehrt onkogene miRNA oder vermindert tumorsuppressive miRNA exprimiert werden. Die folgende Tabelle (Tab. 5) verdeutlicht die denkbaren Dysregulationsmechanismen der miRNA-Biogenese in Tumoren.

**Tabelle 5:** Mögliche Dysregulationsmechanismen der miRNA-Biogenese in Tumoren (Cowland et al. 2007; Ventura et al. 2009).

<b>Mutation/ Epigenetische Veränderung/ Veränderung des Biogeneseapparates</b>	<b>Einfluss auf miRNA</b>
Deletion des miRNA-Lokus	↓ tumorsuppressive miRNA
Amplifikation, Translokation des miRNA-Lokus	↑ onkogene miRNA
Mutation, Polymorphismus der miRNA-Gene	↓ tumorsuppressive miRNA oder ↑ onkogene miRNA oder Veränderte Wirksamkeit der Biogenese
Mutation in Ziel-mRNA-Genen	Veränderte Bindung der miRNA
Mutation in nicht-Ziel-mRNA-Genen	Veränderte Bindung der miRNA
Mutationen der Enzyme oder Hilfsproteine des Biogeneseapparates	Veränderte Prozessierung
Epigenetische Veränderung (Methylierung der miRNA-Gene, Histonmodifikation, Demethylierung)	↓ tumorsuppressive miRNA oder ↑ onkogene miRNA

MiRNAs, die tatsächlich eine kausale Rolle in der Karzinomentwicklung besitzen und nicht nur durch die Veränderungen während der Krebsentstehung in ihrer Expression variieren, werden als Onkomirs bezeichnet (Esquela-Kerscher et al. 2006). Die ersten miRNAs, die eine Rolle bei der Karzinogenese spielen, wurden bei der chronisch lymphatischen Leukämie entdeckt. Hier zeigte sich, dass auf der Genregion 13q14, welche bei etwa der Hälfte aller chronischen lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ deletiert ist, die Loci für miR-15 und miR-16 liegen, welche folglich als tumorsuppressive miRNAs wirken (Calin et al. 2002). Die miRNAs miR-15 und miR-16 hemmen die Expression des *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) Proteins. Wenn dieses Protein niedrig exprimiert ist, wird Apoptose induziert. Folglich fehlt die Apoptoseinduktion, wenn miR-15 und miR-16 niedrig exprimiert sind und es zu einer Überexpression des Bcl-2-Proteins kommt (Cimmino et al. 2005).

Für weitere Tumorentitäten wurden ebenfalls Alterationen im miRNA-Expressionsmuster gezeigt. MiRNA-Gene liegen häufig in sogenannten fragilen chromosomalen Abschnitten („*fragile sites*“), welche in Karzinomen häufig Bruchstellen darstellen, deletiert („*loss of heterozygosity*“) oder amplifiziert („*minimal amplicons*“) sind (Calin et al. 2004).

Auch für das NZK existieren Untersuchungen zur miRNA-Expression. Diese basieren auf unterschiedlichen Isolierungs- und Untersuchungsmethoden. Weiterhin wurden Studien zu einzelnen Subtypen oder zur Differenzierung zwischen Karzinomgewebe und Normalgewebe durchgeführt. Gottardo et al. untersuchten die miRNA-Expression anhand von Microarrayanalysen von NZK, benigne renale Tumoren und Normalgewebe, d.h. gesundes Gewebe der Niere. Dabei stellte sich heraus, dass vier miRNAs in NZK im Vergleich zu Normalgewebe signifikant hochreguliert waren (Gottardo et al. 2007).

Nakada et al. verglichen anhand von Microarrayanalysen und qPCR Normalgewebe, klarzelliges NZK und chromophobes NZK. Hier waren 43 miRNAs in klarzelligem NZK im Vergleich zu Normalgewebe unterschiedlich exprimiert (Nakada et al. 2008).

In der Studie von Chow et al. wurde Normalgewebe mit dem klarzelligem NZK verglichen. Es wurden 33 unterschiedlich exprimierte miRNAs identifiziert. In dieser Studie wurde weiterhin demonstriert, dass es sich bei den dysregulierten miRNAs um miRNAs handelt, welche bereits für andere Tumoren beschrieben wurden und mit bekannten Chromosomenaberrationen des klarzelligen NZK korrelieren (Chow et al. 2010).

Huang et al. untersuchten anhand von Microarrayanalysen und Northern Blot Normalgewebe und klarzelliges NZK. Dabei zeigten sich zwei hochreguliert und 17 herunterreguliert miRNAs im klarzelligem NZK (Huang et al. 2009).

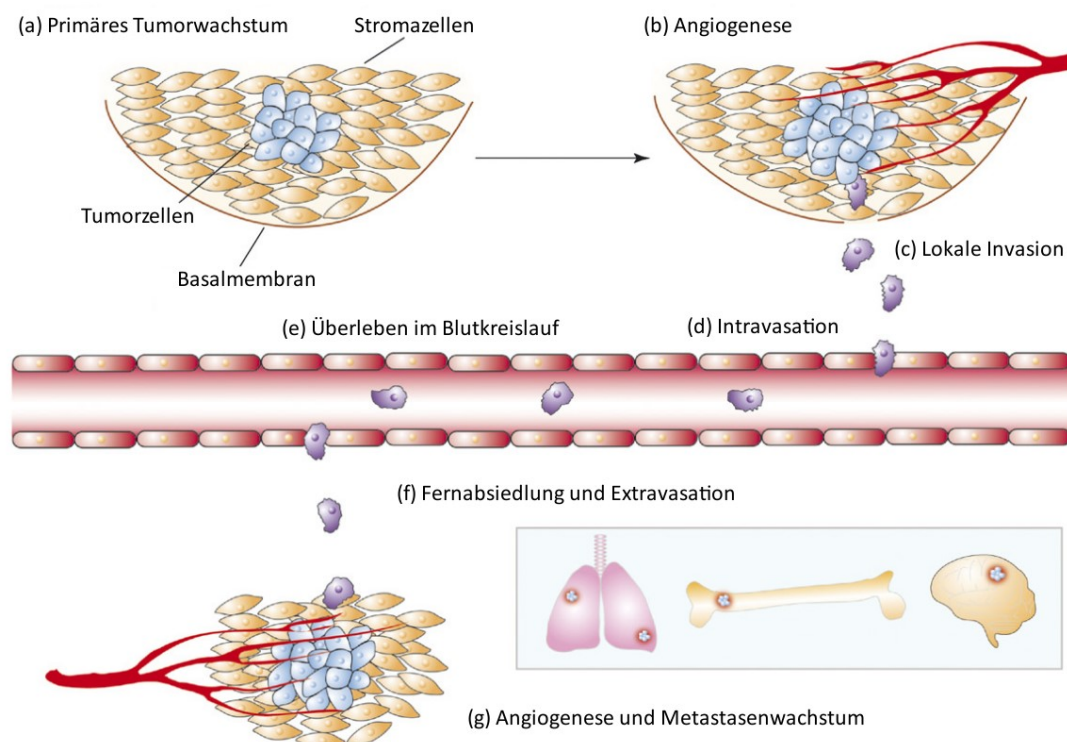
Die Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen den einzelnen Subtypen untersuchten Petillo et al. am klarzelligem NZK, chromophoben NZK, papillären NZK sowie benignen Onkozytom. Bei dieser Studie zeigte sich für jeden Subtyp ein typisches miRNA-Expressionsmuster. Weiterhin wurde unterschieden zwischen Karzinomen mit einer guten Prognose (mehr als 5-Jahres-Überleben nach Nephrektomie) und einer schlechten Prognose (weniger als 5-Jahres-Überleben nach Nephrektomie). Hier wurde eine Hochregulation von miR-32 als Marker für eine schlechte Prognose des klarzelligen NZK identifiziert (Petillo et al. 2009).

In der Studie von Yi et al. wurde Normalgewebe und klarzelliges NZK unter Verwendung von Microarrayanalysen und qPCR verglichen. Hierbei wurden im Tumorgewebe 38 hochregulierte und 48 herunterregulierte miRNAs detektiert (Yi et al. 2010).

Anhand von Microarrayanalysen und qPCR untersuchten White et al. Normalgewebe und klarzelliges NZK auf ihre miRNA-Expressionsunterschiede. Von 166 dysregulierten miRNAs waren 89 hochreguliert und 77 herunterreguliert (White et al. 2011a).

Juan et al. verglichen Normalgewebe und klarzelliges NZK. Dabei fanden sich 9 hochregulierte und 26 herunterreguliert miRNAs im klarzelligem NZK (Juan et al. 2010).

MiRNAs spielen nicht nur bei der Karzinomentstehung, sondern auch bei der Metastasierung eine wesentliche Rolle (Nicoloso et al. 2009). Der Metastasierungsprozess umfasst mehrere Schritte. Zunächst müssen sich Zellen aus dem Primärtumor lösen, durch das anliegende Gewebe migrieren und in die Gefäße invadieren. Anschließend erfolgt in entfernt liegenden Organen die Anheftung an das Gefäßendothel und die Extravasation durch die Blutgefäße. In diesen Organen bilden sich zunächst Mikrometastasen, später Makrometastasen (Abb. 9) (Fidler 2003).



**Abbildung 9:** Darstellung der einzelnen Schritte des Metastasierungsprozesses (Ma et al. 2008).

Für diverse Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass miRNAs eine Rolle bei diesem vielstufigen Metastasierungsprozess spielen. Wie bei der Tumorentstehung selbst existieren miRNAs, die bei einem Metastasierungsgeschehen hoch- oder herunterreguliert sind und die die Metastasierung dementsprechend fördern oder hemmen. Die erste „Metastamir“ wurde von Ma et al. entdeckt. Sie zeigten, dass in metastasierten Brustkrebszelllinien miR-10b hoch exprimiert ist und dadurch Migration und Invasion verstärkt werden (Ma et al. 2007). Für das NZK existieren bezüglich des Metastasierungspotenzials und der entsprechenden miRNA-Expression des Primärtumors bisher nur wenige Arbeiten.

Da miRNAs typische Expressionsmuster in Karzinomen zeigen und sich sowohl zwischen dem gesunden Gewebe und dem dazugehörigen Tumorgewebe als auch zwischen einzelnen

Karzinomarten unterscheiden, könnten sie sich als Diagnosemarker eignen. Beispielsweise konnten Lu et al. in einer Studie durch die miRNA-Expressionsanalyse von 200 miRNAs von 17 histologisch nicht zugeordneten Tumoren (*cancer of unknown primary site*) 12 Tumoren exakt klassifizieren (Lu et al. 2005). Um miRNAs als Diagnosemarker nutzen zu können, wäre die Untersuchung der miRNA-Expression in Serum oder Urin angezeigt.



### 3. Ziele der Arbeit

Klarzellige NZK stellen hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren dar. Sowohl die Prognose als auch die Behandlung des Patienten hängt wesentlich vom Auftreten von Metastasen ab. Insbesondere synchron metastasierte Tumoren besitzen eine schlechte Prognose. Bislang konnten keine klinisch relevanten Biomarker identifiziert werden, die das prognose-bestimmende Metastasierungspotenzial des Primärtumors definieren oder es erlauben, eine individuelle Prognosebewertung vornehmen zu können.

MiRNAs spielen eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung und der Metastasierung. Im Rahmen dieser Arbeit sollen spezifische miRNAs für metastasierende NZK definiert werden, die als potentielle prognostische Marker für ein frühes Metastasierungsereignis geeignet sind. Basierend auf einer vorangegangenen Microarrayanalyse wurden Kandidaten-miRNAs ausgewählt, die eine differenzierte Expression in synchron metastasierten Tumoren aufzeigen. Die miRNA-Expressionsunterschiede sollen mit Hilfe der qPCR quantifiziert und validiert werden.

Des Weiteren soll in funktionellen Assays an der Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-O der Einfluss der identifizierten miRNAs auf wesentliche Schritte der Metastasierung untersucht werden. Zu diesem Zweck werden die miRNAs in den Nierenzellkarzinom-Zelllinien inhibiert bzw. aktiviert und daran anschließend das Migrations-, Invasions- und Proliferationsverhalten der Zelllinien untersucht.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Biologische Materialien**

Für die Analyse der miRNA-Expression wurden Gewebe von Patienten mit NZK verwendet, welches nach partieller oder radikaler Tumornephrektomie zur Verfügung stand. Für die Verwendung der Gewebe lag die Einverständniserklärung der Patienten vor. Um sicherzugehen, dass es sich um klarzellige NZK handelt, erfolgte postoperativ eine Begutachtung der Gewebe durch einen Pathologen. Hierbei wurden die Gewebe nach der WHO-Klassifikation von 2010 für Tumoren des urogenitalen Systems histologisch klassifiziert. Bis zu ihrer Verarbeitung wurden die Gewebe sofort nach der operativen Entnahme bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der urologischen Tumorbank aufbewahrt.

Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug bis zu 225 Monate, mindestens aber 77 Monate bei den nicht metastasierten Tumoren, um eine eventuelle späte Metastasierung ausschließen zu können. Für die späte Metastasierung wurde ein Metastasierungszeitraum von mindestens 31 Monate festgelegt. Insgesamt wurden 33 Patienten in die Untersuchung einbezogen. Die wesentlichen Merkmale des Patientenkollektivs sind in Tab. 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Übersicht über das Patientenkollektiv

		qPCR für let7	qPCR für miR
<b>Anzahl der Patienten</b>		30	30
<b>Alter</b>	<b>Mittelwert</b>	58,3	58,6
	<b>Median</b>	58	59
	<b>Spanne</b>	40-78	40-77
<b>Geschlecht</b>	<b>Männer/Frauen</b>	17/13	16/14
<b>T-Kategorie</b>	<b>1a</b>	8	6
	<b>1b</b>	13	14
	<b>2</b>	2	2
	<b>3a</b>	3	5
	<b>3b</b>	4	3
<b>Grading</b>	<b>1</b>	11	11
	<b>2</b>	17	18
	<b>3</b>	2	1
<b>Gesamtes Follow-up in Monaten</b>	<b>Mittelwert</b>	100,9	101,1
	<b>Median</b>	106	105,5
	<b>Spanne</b>	8-225	8-225
<b>Follow-up der nicht metastasierten Tumoren in Monaten</b>	<b>Mittelwert</b>	113,5	117,9
	<b>Median</b>	115	119
	<b>Spanne</b>	77-165	77-165
<b>Follow-up der spät metastasierten Tumoren in Monaten</b>	<b>Mittelwert</b>	109,4	109,4
	<b>Median</b>	104	104
	<b>Spanne</b>	38-225	38-225
<b>Follow-up der synchron metastasierten Tumoren in Monaten</b>	<b>Mittelwert</b>	69,9	62,3
	<b>Median</b>	66	45
	<b>Spanne</b>	8-128	8-128
<b>Fälle mit Metastasierung</b>	<b>nein/ ja</b>	15/15	15/15

<b>Zeitpunkt der Metastasierung in Monaten</b>	<b>Mittelwert</b>	81	81
	<b>Median</b>	68,6	68,6
	<b>Spanne</b>	31-107	31-107
<b>Lokalisation der Metastase</b>	<b>Lunge</b>	8	8
	<b>Peritoneum, Retroperitoneum</b>	2	1
	<b>Skelett</b>	1	1
	<b>Haut</b>	1	1
	<b>Kontralaterale Niere</b>	1	1
	<b>Nebenniere</b>	0	1
	<b>Leber</b>	1	1
	<b>Lymphknoten</b>	1	1

## 4.2 Geräte und Programme

Für die Untersuchung wurden folgende Geräte verwendet:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Abzug Model 3650	Labcaire; Clevedon; UK
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies; Santa Clara; USA
Cryostat Microm HM 500OM	Microm; Walldorf; Deutschland
Inkubator Sanyo CO2 Incubator	Sanyo; Leicestershire; UK
Millicell Cell Culture Inserts	Millipore; Billerica; USA
LightCycler® 480	Roche; Mannheim; Deutschland
LightCycler ® 480 Software release 1.5.0	Roche; Mannheim; Deutschland
Mikroskop Telaval 31	Zeiss; Jena; Deutschland
NanoDrop 1000 V3.7.1	Thermo Scientific; Wilmington; USA
PCR-Gerät PTC-200; MJ Research	Bio-Rad Laboratories; Herts; UK
Reaktionsgefäße LoBind® Tubes	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäße 10ml; 50ml	Greiner Bio-One; Frickenhausen; Deutschland
REST (Relative Expression Software Tool) 2008	M.W. Pfaffl; München; Deutschland
Sicherheitswerkbank Heraeus®	Thermo Scientific; Wilmington; USA
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific; Wilmington; USA
Spektrophotometer Tecan GENios	Tecan Grup; Männedorf; Schweiz
Microplate Reader	
SPSS – Software for Predictive Analytics Version 16	IBM; Ehningen; Deutschland
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer; Griesheim; Deutschland
Tisch-Thermostat ThermoStat plus	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries; New York; USA
Well-Platten	Greiner Bio-One; Frickenhausen; Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar®	Greiner Bio-One; Frickenhausen; Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus; Buckinghamshire; UK
Zentrifuge MiniSpin® Plus	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Zentrifuge Sprout®	Heathrow Scientific; Nottingham; UK

Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Zentrifuge Universal 32R	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen; Deutschland

### 4.3 Chemikalien und Kitsysteme

Für die Untersuchungen kamen folgende Chemikalien und Kitsysteme zum Einsatz:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Acid Phenol: Chloroform	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies; Santa Clara; USA
Alfazym	PAA Laboratories; Pasching; Österreich
DEPC Treated Water (Nuclease Free)	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; St. Louis
Eisessig	Merck; Darmstadt; Deutschland
Ethanol	Nordbrand Nordhausen GmbH Alkoholvertrieb; Nordhausen; Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG; Berlin; Deutschland
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen; Hilden; Germany
Kristallviolett	Merck; Darmstadt; Deutschland
Matrigel	Becton Drive; Franklin Lakes; USA
miScript miRNA Inhibitors/ Mimics	Qiagen; Hilden; Germany
mirVana <sup>TM</sup> miRNA Isolierungs Kit	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrome AG; Berlin; Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
TaqMan® MicroRNA Assays (Primer)	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transkription Kit	Ambion Applied Biosystems; Austin; USA
Trizol Reagent	Invitrogen GmbH; Darmstadt; Deutschland
Cell Proliferation Reagent Water soluble tetrazolium (WST)-1	Roche; Mannheim; Deutschland
Zellmedien (Gibco®)	Invitrogen GmbH; Darmstadt; Deutschland

## 4.4 Gewebeaufarbeitung

30 mg der kryokonservierten Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Kryostaten bei -24 °C in 10 µm dünne Schichten geschnitten, um eine optimale Lyse der Zellen zu ermöglichen. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebeschnitte in DNase- und RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben.

## 4.5 RNA-Isolation

Für die Isolierung der RNA aus Geweben wurden drei unterschiedliche RNA-Isolierungsmethoden verwendet. Die RNA-Isolierung wurde mit Trizol und mit dem miRVana-Kit durchgeführt. Der miRVana-Kit wurde sowohl für die Isolierung von angereicherter miRNA als auch von Gesamt-RNA verwendet. Für die Isolierung der RNA aus Zellkulturen wurde nur die Gesamt-RNA-Isolierung mit dem miRVana-Kit durchgeführt.

### 4.5.1 RNA-Isolierung mit Trizol

Im folgenden Abschnitt wird die RNA-Isolierung mit Trizol beschrieben. Zu den Gewebeschnitten erfolgt die Zugabe von jeweils 1 ml Trizol. Trizol ist eine Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat (Chomczynski et al. 1987), welche eine Lyse der Zellen bewirkt. Das Gewebe wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Separation der RNA wird zu den Proben jeweils 200 µl Chloroform hinzu gegeben und die Lösung für 15-30 s durchmischt. Anschließend erfolgt eine Inkubation des Ansatzes für 2-3 min bei Raumtemperatur und ein Zentrifugieren für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C. In dem Reaktionsgefäß entstehen während des Zentrifugierens drei Schichten. Die obere wässrige Phase enthält RNA, die mittlere DNA und die unterste organische Schicht Proteine. Die wässrige Phase mit der RNA wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Gemisch werden zur Fällung der RNA 500 µl Isopropanol gegeben. Die Probe wird gründlich gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Beim folgenden Zentrifugieren für 12 min bei 10000 rpm und 4 °C entsteht ein RNA-Pellet.

Der Überstand wird abgenommen und zu dem verbleibenden Pellet wird 1 ml Ethanol (75 %) hinzugegeben. Dies dient dem gründlichen Auswaschen des Isopropanols, da diese Substanz

die anschließenden Arbeitsschritte negativ beeinflusst. Der Ansatz wird wiederum für 10 min bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Als nächster Schritt erfolgt eine Trocknung des Pellets bei 42 °C im Thermocycler, um das Ethanol zu entfernen, da dieses Enzyme hemmt. Anschließend wird das Pellet im letzten Arbeitsschritt in 100 µl RNase freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -28 °C aufbewahrt.

#### 4.5.2 RNA-Isolierung mit Anreicherung der miRNA aus Geweben

Zur angereicherten miRNA-Isolierung wird der miRVana-Isolierungskit verwendet. Die Isolierung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wird zu der Gewebeprobe Lysis/Binding-Puffer im Verhältnis 1:10 hinzugegeben und auf Eis inkubiert. Nachdem sich das Gewebe vollständig aufgelöst hat, wird 1/10 des Puffers miRNA Homogenate Additive dazugegeben, durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die RNA mit Acid-Phenol/Chloroform entsprechend der Menge des Puffers extrahiert. Das Gemisch wird für etwa 30 s durchmischt und dann für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird mit der darin enthaltenen RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Als nächster Schritt erfolgt die Anreicherung der miRNA. Zunächst wird das Volumen der wässrigen Phase bestimmt und mit 1/3 Ethanol (100 %) gemischt. Dieses Gemisch wird anschließend in ein neues „*Collection Tube*“ mit einem „*Filter Cartridge*“ gegeben und für 15 s bei 10.000 g durchmischt. Da das Fassungsvermögen dieses Reaktionsgefäßes maximal 700 µl beträgt, muss dieser Schritt gegebenenfalls wiederholt werden und der Durchfluss aufgefangen werden. Der Filter enthält chaotrophe Salze, die bei dieser Ethanolkonzentration die langkettigen RNA-Moleküle binden, so dass sich in der Lösung nach dem Zentrifugieren nur noch die kurzkettigen RNA-Moleküle (<200 Nukleotide) inklusive der miRNA befinden. Der Filter wird verworfen und das Volumen der Lösung bestimmt. Zu der Lösung wird 2/3 Ethanol (100 %) hinzugegeben und durchmischt. Diese Lösung wiederum wird in ein neues „*Collection Tube*“ mit Filter gegeben. Jetzt werden die kurzkettigen RNA-Moleküle am Filter gebunden und der Durchfluss verworfen.

Um die chaotrophen Salze und sonstige Verunreinigungen zu entfernen, wird der Filter mit der gebundenen RNA in den folgenden Schritten gewaschen. Zunächst wird auf den Filter 700 µl „*Wash Solution 1*“ gegeben und bei 10.000 g für 15 s zentrifugiert; der Durchfluss wird verworfen. Jetzt folgt eine Reinigung mit 500 µl „*Wash Solution 2/3*“ mit anschließender Zentrifugation für 15 s. Dieser Schritt wird wiederholt. Um jegliche



Flüssigkeit aus dem Filter zu entfernen, wird dieser für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert und anschließend in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Die RNA muss jetzt aus dem gereinigten Glasfaserfilter entfernt werden. Dies geschieht durch die Zugabe von 100 µl 95 °C heißen Wassers auf den Filter und dem anschließenden Zentrifugieren für 45 s bei 10.000 g. Die so gewonnene angereicherte RNA wird bei -28 °C aufbewahrt.

#### **4.5.3 Gesamt-RNA-Isolierung aus Geweben**

Für die Gesamt-RNA-Isolierung aus Geweben wird das gleiche miRVana-Isolierungskit verwendet wie für die Isolierung angereicherter miRNA. Hierfür wird die gleiche Chloroform/Phenol-Extraktionsprozedur verwendet. Die obere wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Volumen bestimmt. Die Aufreinigung mit Ethanol erfolgt nach einem anderen Schema. Zunächst wird das 1,25fache der Ausgangslösung an Ethanol (100 %) hinzugefügt und gut durchmischt. Die Lysat/Ethanol-Mischung wird in ein neues Reaktionsgefäß mit „*Filter Cartridge*“ gegeben, maximal 700 µl pro Zentrifugationsschritt, und anschließend für 15 s bei 10.000 g zentrifugiert. Hierbei bindet die Gesamt-RNA am Filter, der Überstand kann folglich verworfen werden. Um die chaotropen Salze und die Puffersalze aus dem Filter zu waschen, werden die gleichen Waschschrte wie bei der Isolierung angereicherter miRNA durchgeführt. Die RNA-Entfernung aus dem Filter erfolgt ebenfalls auf die gleiche Art und Weise.

#### **4.5.4 Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellkulturen**

Für die Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen werden zunächst die Zellen geerntet. Hierfür wird zunächst das Medium von den Zellkulturen abgenommen. Anschließend wird die Zellkulturflasche mit 3 ml PBS gewaschen und 1 ml Alkazym wird hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Brutschrank werden die Zellen mit 4 ml Medium abgelöst und in ein 12 ml-Röhrchen gegeben. Dieses wird für 5 min bei 900 g zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 1 ml PBS gelöst und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach zwei weiteren Zentrifugierungsschritten und einem nochmaligem Waschen mit PBS wird der Überstand abgenommen und das Pellet trocken über Nacht bei -80 °C

eingefroren. Zu dem Pellet werden dann 500 µl Lysis/Binding-Puffer hinzugegeben, und es erfolgt die Isolierung der RNA nach dem Schema der Gesamt-RNA-Isolierung aus Gewebe.

#### **4.6 RNA-Konzentrations- und Qualitätsmessung**

Um die Konzentration und die Reinheit der RNA zu bestimmen, wird das NanoDrop-Spektrophotometer und das entsprechende Programm ND 1000 verwendet. Mit diesem Gerät können bei verschiedenen Wellenlängen diverse Molekülkonzentrationen bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 260 nm kann die RNA-Konzentration gemessen werden. Um die Reinheit zu bestimmen, wird die Absorption bei Wellenlängen von 280 nm und 230 nm ausgewertet. Eine Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm spricht für eine Verunreinigung der Probe durch Proteine. Bei einer Absorption von 230 nm ist von einer Verunreinigung durch Lösungsmittel auszugehen. Die jeweiligen Verunreinigungen werden in Anteilen ausgegeben. Ein optimales 260/280- sowie 260/230-Verhältnis liegt zwischen 1,8 und 2,0.

Die eigentliche Qualitätsmessung der RNA erfolgt allerdings mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer. Hierfür wird der Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Zunächst wird das Gel vorbereitet, indem 550 µl des Gels in einen Spin-Filter gegeben werden und anschließend ein Zentrifugieren für 10 min bei 1500 g und Raumtemperatur erfolgt. Von dem gefilterten Gel werden anschließend 65 µl in ein DNase- und RNase-freies 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 1 µl RNA 6000 Nano dye concentrate wird das Gel durchmischt und für 10 min bei 13.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Auf den RNA 6000 Nano Chip werden zuerst jeweils 9 µl des Gels in die dafür vorgesehenen Wells gegeben und durch Erzeugung eines Überdrucks in den Mikrokanälen des Chips verteilt. Anschließend werden jeweils 5 µl RNA 6000 Nano Marker in die verbleibenden 13 Wells hinzugefügt. Im letzten Schritt erfolgt die Zugabe von 1 µl der Proben und 1 µl Ladder in die vom Hersteller definierten Wells. Der Chip wird für 1 min bei 2400 rpm durchmischt. Durch Gelelektrophorese erfolgt die Qualitätsmessung im Agilent 2100 Bioanalyzer.

Durch die standardisierte Bestimmung der RNA-Integritätszahl (RIN) kann eine Aussage über die Qualität der RNA-Proben getroffen und der Degradierungszustand eingeschätzt werden. Bei Proben mit einem RIN-Wert über 7 ist der Degradierungszustand so gering, dass sie für die nachfolgenden Analysemethoden geeignet sind.

## 4.7 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

### 4.7.1 Reverse Transkription

Um eine PCR durchzuführen, muss die RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase umgeschrieben werden. Für die Umschreibung sind spezifische Primer notwendig, an denen die reverse Transkriptase ansetzen kann und die weiterhin garantieren, dass nur die zu untersuchende miRNA in cDNA umgeschrieben wird (Jansohn 2007).

Die Reverse Transkription (RT) wird mit Hilfe des RT-Kits der Firma Ambion nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird zunächst der RT-Mastermix hergestellt. Pro Ansatz werden hierfür 0,15 µl dNTPs, 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase, 1,5 µl Reverse Transkriptions Buffer, 0,19 µl RNase Inhibitor und 4,16 µl nukleasefreies Wasser verwendet. Pro Probenansatz werden jeweils 7 µl Mastermixe, 5 µl der Probe (mit einer Konzentration von 20 ng/µl) und 3 µl des jeweiligen RT-Primers in 0,2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Die Lösungen werden zügig durchmischt, zentrifugiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert.

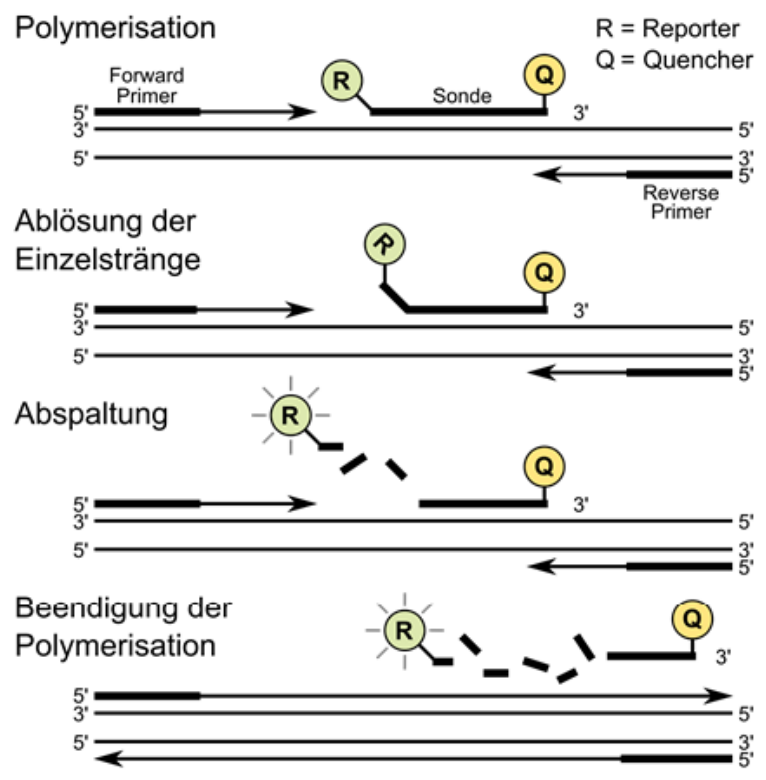
Anschließend erfolgt die Reverse Transkription im PCR-Gerät. Folgendes Programm wird dafür verwendet:

	Zeit in Minuten	Temperatur in °C
Primerhybridisierung	30	16
Elongation	30	42
Denaturierung	5	85
	∞	4

### 4.7.2 Quantitative Realtime-PCR

Im folgenden Abschnitt wird die Durchführung der relativen Quantifizierung der miRNA unter Durchführung einer qPCR beschrieben. Die qPCR wurde unter Verwendung des Gene Mastermix, der spezifischen TaqMan Primer und sequenzspezifischer Sonden im Lightcycler durchgeführt.

Diese Sonden binden an die zu untersuchende Region und bestehen neben den komplementären Basen aus einem gebundenen Quencher und einem gebundenen Reporter. Der Reporter kann unter Anregung fluoreszieren. Dies funktioniert allerdings nur, wenn der Quencher, der die Fluoreszenz absorbiert, vom Reporter getrennt ist. Durch die Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase werden die einzelnen Nukleotide der Sonde abgespalten und Quencher und Reporter voneinander getrennt. Die Fluoreszenz ist proportional zu den cDNA-Kopien der zu untersuchenden miRNA (Jansohn 2007).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des Ablaufs der qPCR (nach Applied Biosystems).

Verglichen wird die Stärke der Fluoreszenz anhand des *Crossing point*-Wertes (CP-Wert). Dieser Wert gibt an, nach wie vielen Zyklen die Fluoreszenzintensität aus der Hintergrundfluoreszenz hervortritt. Der CP-Wert sollte sich optimalerweise zwischen 20-30 Zyklen befinden.

Für die qPCR wird zunächst für jeden einzelnen Primer der Mastermix angesetzt. Hierfür werden entsprechend für jede Probe 0,5 µl TaqMan MicroRNA Assay Primer, 5,0 µl TaqMan Gene Mastermix und 3,5 µl nukleasefreies Wasser in ein Reaktionsgefäß gegeben. In eine 96-Well-Platte werden jeweils von einer Probe drei biologische Replikate von je 1 µl gegeben. Zu den einzelnen Proben erfolgt die Zugabe von 9 µl des entsprechenden miRNA-Mastermixes. Als Referenz wird zusätzlich für jede Probe der Primer RNU48 verwendet. Die Negativkontrolle wird als *No Template Control* (NTC) bezeichnet und besteht aus 1 µl Wasser und 9 µl Mastermix.

Anschließend wird die Platte mit Folie luftdicht verschlossen und für 1 min bei 1000 g zentrifugiert. Danach wird die Platte in den Lightcycler gegeben und mit folgendem miRNA-Programm gemessen:

	Aktivierung des Gold Enzyms für den gesamten Zeitraum der PCR	Denaturierung	Annealing und Elongation
	AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR	
Schritt	Hold	Zyklus (40 Zyklen)	
Zeit	10 min	15 s	60 s
Temperatur in °C	95	95	60

## 4.8 Verwendung von SPSS

Zur Darstellung der Unterschiede zwischen den gemessenen CP-Werten wurden Boxplots der normalisierten CP-Werte mit Hilfe von SPSS erstellt. Ein normalisierter CP-Wert ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Normalisierter CP-Wert} = \frac{\text{Effizienz der Ziel-RNA}^{\text{CP-Wert der Ziel RNA}}}{\text{Effizienz von RNU48}^{\text{CP-Wert von RNU48}}}$$

Für die Erstellung der ROC-Kurven wurden die normalisierten CP-Werte der Messung mit angereicherter miRNA verwendet. Unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS wurden die *Receiver Operating Characteristic*-Kurven (ROC-Kurven) erstellt, mit deren Hilfe für jede miRNA ein Cut-Off Wert bestimmt werden konnte, der die einzelnen Metastasierungsgruppen unterscheidet. Dabei wurde jeweils ein Trennwert mit einer hohen

Sensitivität und einer hohen Spezifität gewählt. Aus den ROC-Kurven ergeben sich weiterhin die „*Area under curve*“ (AUC), wobei eine ROC-Kurve mit einer AUC=0,5 wertlos und einer AUC=1 ideal ist.

## 4.9 Zellkulturen

Für die Zellkulturversuche wurde mit der Zelllinie 786-O gearbeitet. Diese Zelllinie entstammt aus einem primären klarzelligen NZK. Sie wurde bei der radikalen Nephrektomie eines 58-jährigen Mannes gewonnen (Williams et al. 1978).

Für diese Zellkultur wird folgendes Nährmedium benötigt: 50 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 50 % Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) + 10 % FKS.

Die Zelllinie wird bei 37 °C aufgetaut, das Einfriermedium (bestehend aus 60 % des jeweiligen Mediums, 30 % FKS und 10 % DMSO) wird abzentrifugiert, die Zellen werden in dem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen angezüchtet. Die Kultivierung der Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37 °C und 5 %CO<sub>2</sub>. Zum Entfernen des restlichen zytotoxischen Einfriermediums wird am darauf folgenden Tag das Medium erneuert.

## 4.10 Transfektion

Für die Inhibition (Knockdown) bzw. Überexpression (Mimic) der miRNA wurden die Zelllinien 786-O transient transfiziert. Für die Transfektion wird das Transfektionsprotokoll von Qiagen verwendet.

Im ersten Schritt werden kurz vor der Transfektion die Zellen aus der Zellkulturflasche geerntet. Hierfür wird zunächst das Medium abgenommen, danach werden die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wird Accutase in die Zellkulturflaschen gegeben und diese dann für 10 min in den Brutschrank gestellt. Dann wird das Medium über die Zellen gegeben, und die Zellen werden für 5 min bei 900 rpm und 24 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen resuspendiert. Hiervon werden 10 µl abgenommen und in eine Neubauerzählkammer gegeben, um die Zellkonzentration zu bestimmen. Auf die 6-Well-Platte werden in jedes Well jeweils so viele Zellen gegeben, dass sich nach 24 h eine Dichte von 50-80 % ergibt und auf 2 ml mit Medium aufgefüllt.

Um den Inhibitions- bzw. Überexpressionskomplex zu erzeugen, wird der entsprechende miRNA-Inhibitor bzw. das Mimic in 100 µl serumfreies Medium (Opti-Mem) gegeben und

anschließend HiPerFect Transfektions-Reagenz dazugegeben. Die Menge an Inhibitor bzw. Mimic und HiPerFect variierten je nach Versuchsansatz. In dieser Arbeit werden die Konzentrationen wie folgt angegeben: z.B. 12+50cH, wobei die erste Zahl die Konzentration des Inhibitors bzw. Mimics in  $\mu\text{l}$  darstellt und die zweite Zahl die Konzentration von HiPerFect in  $\mu\text{l}$  angibt. Anschließend wird das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Komplexbildung zu gewährleisten.

Unter Schwenken der Well-Platte wird der Komplex aus miRNA-Inhibitor und HiPerFect tropfenweise auf die einzelnen Wells gegeben. Ein Well wird als Negativkontrolle belassen. Die Well-Platte wird anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Um die Inhibition mit Hilfe der qPCR nachweisen zu können, werden die Zellen nach 24 h geerntet. Hierfür wird zunächst wieder das Medium von den einzelnen Wells abgenommen, die Zellen werden mit 1 ml PBS gewaschen und auf jedes Well werden 200  $\mu\text{l}$  Alfabzym gegeben. Die 6-Well-Platte wird für 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen in den Wells werden anschließend mit je 1 ml Medium abgelöst. Das Medium inklusive der abgelösten Zellen wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden für 5 min bei 1500 g und 24 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wird das Medium durch zweimaliges Waschen mit PBS aus dem Pellet entfernt. Das trockene Zellpellet wird bei -80 °C eingefroren.

### 4.11 Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay werden die Zellen 24 h nach der Transfektion geerntet und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Danach werden die Zellen in einer Dichte von etwa 60 % in 24-Well-Platten gegeben und mit Medium aufgefüllt, so dass ein Gesamtvolumen von 500 µl pro Well besteht. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wird das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen werden mit 500 µl PBS gewaschen und 500 µl frisches Medium werden auf jedes Well gegeben. Anschließend wird auf jedes Well 10 % WST gegeben. Weiterhin wird eine Negativprobe mit 500 µl Medium und 10 % WST angefertigt. Wenn das ursprünglich rote WST durch die Zellen in gelbes Formazan umgesetzt wurde, werden von jedem Well 200 µl Medium abgenommen und in einer 96-Well-Platte eine 1:2 Verdünnungsreihe mit jeweils 100 µl PBS angefertigt. Anschließend werden die einzelnen Konzentrationen des Formazans durch den Tecan Genios Microplate Reader und das Programms Magellan 3 ausgewertet.

### 4.12 Migrationsassay

Um den Migrationsassay durchzuführen, werden 24 h nach der Transfektion die Zellen geerntet. Das Abspülen der Zellen erfolgt mit FKS-freiem Medium, welches gemeinsam mit den Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben wird. Diese werden bei 900 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, die Zellen werden in FKS freiem Medium resuspendiert und anschließend in der Neubauerzählkammer gezählt.

In eine 24-Well-Platte werden 500 µl FKS haltiges Medium vorgelegt, um einen Gradienten zu erzeugen. Danach werden die Inserts in die Wells gegeben und mit FKS-freiem Medium befüllt. Anschließend werden die Zellen, mit einer Dichte von etwa 80 % in die Wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank werden die Inserts aus dem Medium genommen und zweimalig mit 500 µl destilliertem Wasser gewaschen. Danach werden die Zellen mit 500 µl Ethanol (75 %) für 20 min auf Eis inkubiert und dadurch fixiert. Es erfolgt anschließend wieder ein zweimaliges Waschen mit 500 µl destilliertem Wasser. Die verbleibenden Zellen auf der Oberseite des Inserts werden durch Abwischen mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Inserts werden getrocknet, bevor im nächsten Schritt 500 µl Kristallviolettlösung (0,1 %) dazugegeben wird, welches die Zellen anfärbt. Das überschüssige Kristallviolett wird durch Waschen in destilliertem Wasser entfernt.



Anschließend werden die Insert wieder getrocknet. Die Zellen werden durch Zugabe von 200 µl Eisessig (10 %) lysiert und der Farbstoff wird somit freigesetzt. 200 µl der Lösung werden in eine 96-Well-Platte überführt und anschließend wird die Konzentration des Farbstoffs im Tecan Genios Microplate Readers bei 595 nm gemessen.

### **4.13 Invasionsassay**

Für den Invasionsassay werden die Zellen wie bei dem Migrationsassay 24 h nach der Transfektion geerntet und gezählt. Anschließend werden die Inserts präpariert, indem 50 µl Matrigel (1:3 verdünnt mit Medium) gleichmäßig auf die Membran aufgetragen und diese für 30 min bei 37 °C getrocknet werden. Die Inserts mit der festen Matrigelbeschichtung werden in Wells mit 500 µl vorgelegtem Medium gegeben. In die Inserts werden 200 µl Medium gegeben und die Zellen mit einer Dichte von etwa 80 % ausgesät.

Nach 24 h erfolgt die Auswertung des Invasionsassays auf gleiche Weise wie bei dem Migrationsassay.

### **4.14 Auswertung der Zellversuche**

Um eine einheitliche Auswertung der Zellversuche zu erzielen und alle äußeren Einflussfaktoren, wie z.B. Passage der Zellen zu berücksichtigen, werden die Versuche tageweise ausgewertet. Dafür wird der Mittelwert der Kontrollen als 100 % für jeden Tag einzeln angesetzt und dazu die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Werte des Tages berechnet. Die prozentualen Verhältnisse der Kontrollwerte und der mit Mimic bzw. Inhibitor behandelten Zellen der verschiedenen Tage werden dann zusammengefasst und unter zu Hilfenahme von SPSS miteinander verglichen.

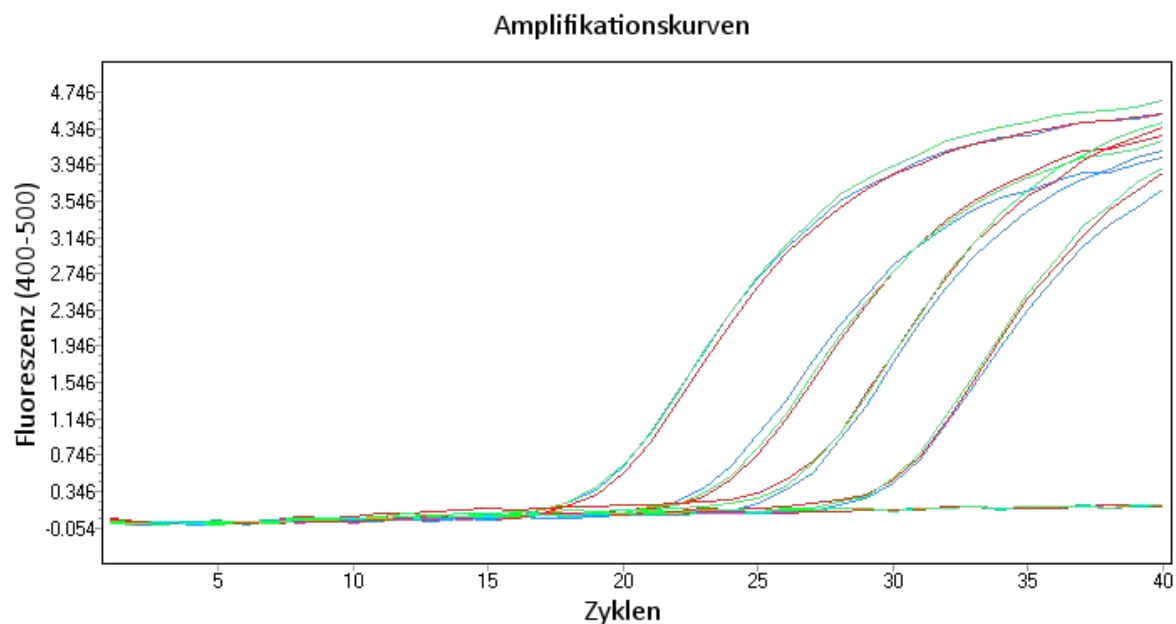
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Vorversuche qPCR

Die Kandidaten-miRNAs, welche mit der vorangegangenen Microarrayuntersuchung identifiziert wurden, sollten durch qPCR in ihren Expressionsunterschieden quantifiziert und validiert werden.

Zunächst erfolgte die Etablierung des Probeneinsatzes. Um zu ermitteln, in welcher Konzentration und Verdünnung die Probe vorliegen muss, um eine Messung im optimalen CP-Bereich zwischen 20-30 Zyklen zu erzielen, wurden in Vorversuchen verschiedene Probenkonzentrationen eingesetzt und Verdünnungsreihen angefertigt (Daten nicht gezeigt). Diese Vorversuche ergaben, dass die Proben in einer Konzentration von 100 ng und einer Verdünnung nach der reversen Transkriptase von 1:2 verarbeitet werden sollten.

Außerdem musste für jeden Primer die Effizienz ermittelt werden. Die Effizienz entspricht der Vervielfältigung der DNA pro Zyklus und sollte sich zwischen 1,6 und 2,0 befinden. Die Effizienzen wurden mit einer 10er-Verdünnungsreihe nach der reversen Transkriptase (Abb. 11) und einer entsprechenden Standardkurve, die mit der Auswertungssoftware des Lightcyclers 480 erstellt wurde, bestimmt. In der Tabelle (Tab. 7) sind die Effizienzen für die einzelnen Primer aufgeführt.



**Abbildung 11:** Effizienzmessung für miR-125b mit Hilfe einer entsprechenden Verdünnungsreihe.

**Tabelle 7:** Effizienzen der Primer

Primer	Effizienz
let-7a	1,87
let-7b	1,70
let-7c	1,86
miR-26a	2,00
miR-30b	1,91
miR-30c	1,94
miR-125b	1,94
miR-145	1,97
RNU48	1,95

## 5.2 qPCR-Validierung mit filterbasierender Isolierung der angereicherten miRNA

Um die Array-Daten zu validieren, wurde die qPCR unter Verwendung von angereicherter miRNA durchgeführt. Dazu wurde angereicherte miRNA aus synchron metastasierten (n=8), spät metastasierten (n=7) und nicht metastasierten (n=10) klarzelligen NZK isoliert. Die qPCR wurde mit den Primern für let-7a, let-7b, let-7c, miR-26a, miR-30b, miR-30c, miR-125b, miR-145 und der Referenz RNU48 durchgeführt. Diese miRNAs wurden verwendet, da sie in der Microarray-Analyse sehr gut zwischen synchron metastasierten und spät bzw. nicht metastasierten Tumoren differenzieren konnten.

Bei der Auswertung der qPCR-Ergebnisse mit dem Softwareprogramm REST wurden synchron metastasierte Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren verglichen, um hoch aggressive Tumoren abgrenzen zu können.

Für die miRNA let-7a zeigte sich, dass sie in synchron metastasierten Tumoren um das 3,09fache ( $p=0,011$ ) gegenüber spät und nicht metastasierten Tumoren signifikant herunterreguliert ist.

Für let-7b und let-7c konnte eine verringerte miRNA-Expression in synchron metastasierten gegen spät und nicht metastasierte Tumoren um das 2,52fache ( $p=0,039$ ) nachgewiesen werden.

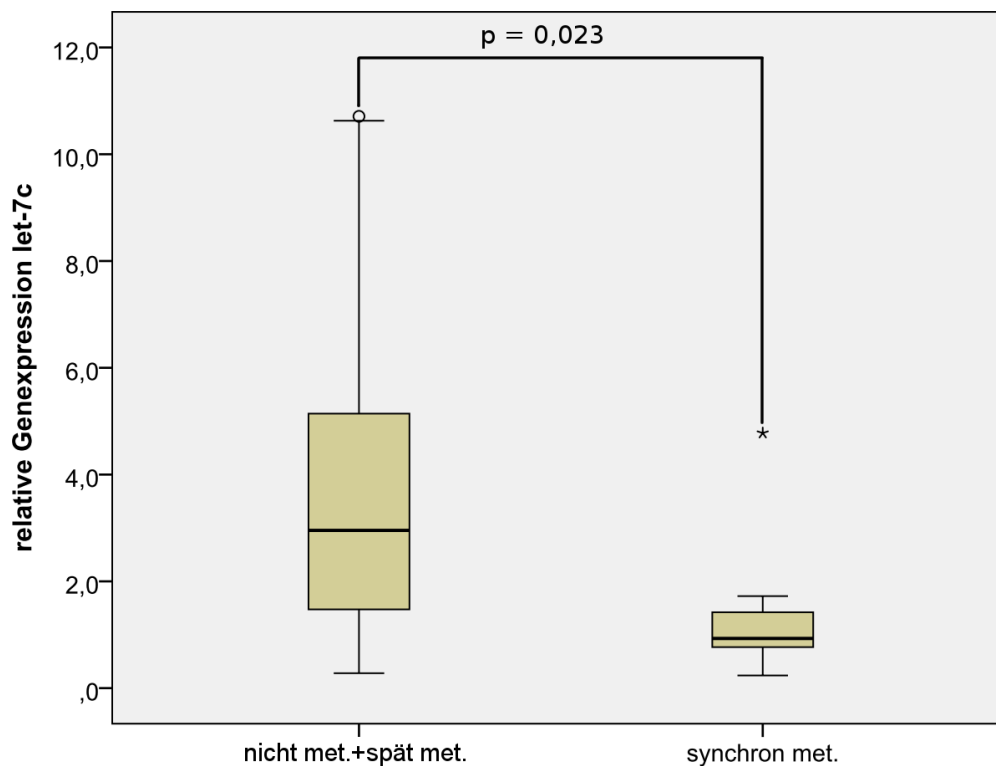
Auch für miR-26a, miR-30b sowie miR-30c wurde ein Unterschied in der miRNA-Expression zwischen synchron metastasierten Tumoren und den spät und nicht metastasierten Tumoren gemessen. Für miR-26a wurde eine Herunterregulierung um das 4,65fache ( $p<0,001$ ), für miR-30b um das 3,51fache ( $p=0,001$ ) und für miR-30c um das 3,8fache ( $p=0,001$ ) nachgewiesen.

Für miR-125b konnte mit der Methode der angereicherten RNA-Isolierung nur eine tendenzielle Veränderung in der miRNA-Expression gezeigt werden. Für miR-145 wurden erniedrigte Expressionswerte in synchron metastasierten gegenüber spät und nicht metastasierten Tumoren gemessen.

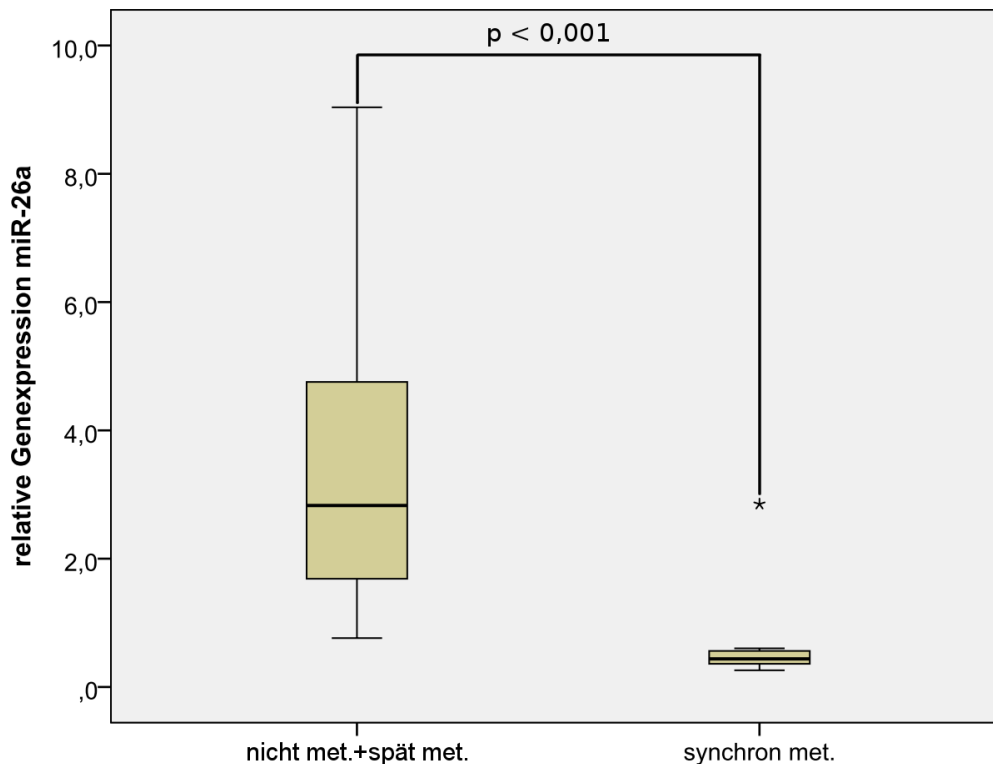
In der folgenden Tabelle (Tab. 8) sind die Signifikanzwerte und die verringerte miRNA-Expression zusammengefasst, die Abbildungen (Abb. 12 und 13) zeigen für let-7c und miR-26a beispielhaft die Verteilung der normalisierten CP-Werte in Form von Boxplots.

**Tabelle 8:** Erniedrigte Expression (Fold-Change) der untersuchten miRNAs in synchron metastasierten Tumoren im Vergleich zu spät und nicht metastasierten Tumoren mit den dazugehörigen Signifikanzwerten (p-Wert, \*=signifikant, \*\*=hochsignifikant, \*\*\*=höchstsignifikant) und Abweichungen.

miRNA	p-Wert	Fold-Change	Abweichung
let-7a	0,011 *	-3,09	Std. Fehler -10,31 – -1,02
let-7b	0,039 *	-2,52	Std. Fehler -10,20 – 1,62
let-7c	0,023 *	-2,63	Std. Fehler -10,20 – 1,39
miR-26a	<0,001 ***	-4,65	Std. Fehler -13,89 – -1,73
miR-30b	0,001 ***	-3,51	Std. Fehler -12,66 – -1,06
miR-30c	0,001 ***	-3,80	Std. Fehler -11,24 – -1,25
miR-125b	0,055	Kein Unterschied	
miR-145	0,014 *	-2,89	Std. Fehler -11,63 – 1,74



**Abbildung 12:** Verteilung der normalisierten CP-Werte von synchron metastasierten gegen spät und nicht metastasierte Tumoren für miRNA let-7c (angereicherte miRNA).



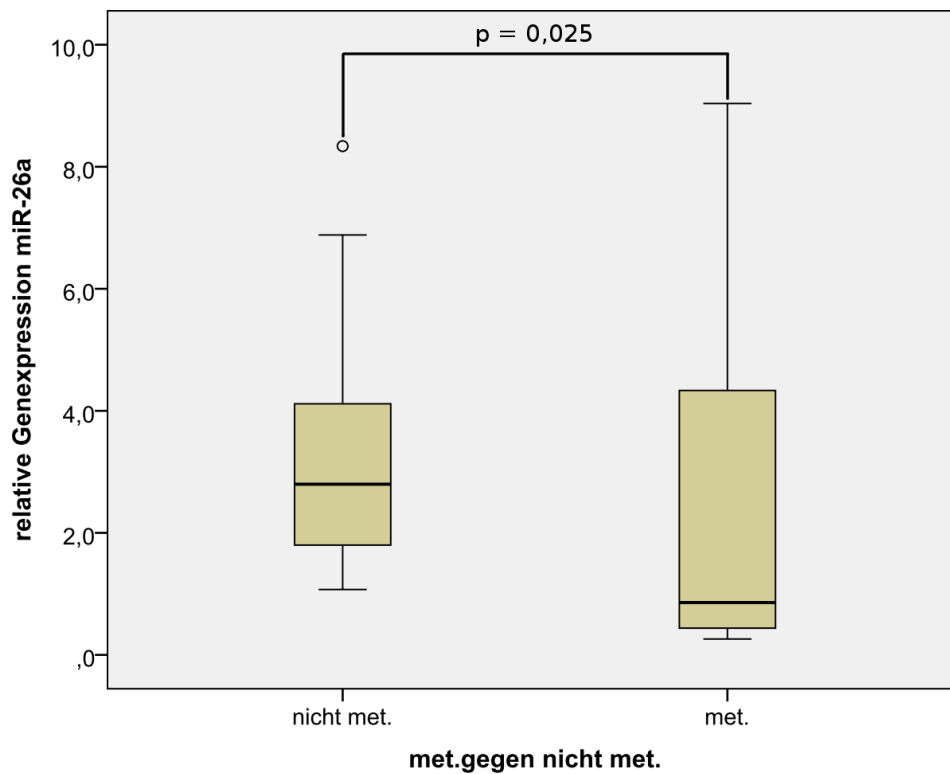
**Abbildung 13:** Verteilung der normalisierten CP-Werte von synchron metastasierten gegen spät und nicht metastasierte Tumoren für miRNA miR-26a (angereicherte miRNA).

Weiterhin wurden synchron und spät metastasierte Tumoren gegen nicht metastasierte Tumoren ausgewertet, um zu prüfen, ob metastasierte Tumoren von nicht metastasierten Tumoren unterschieden werden können.

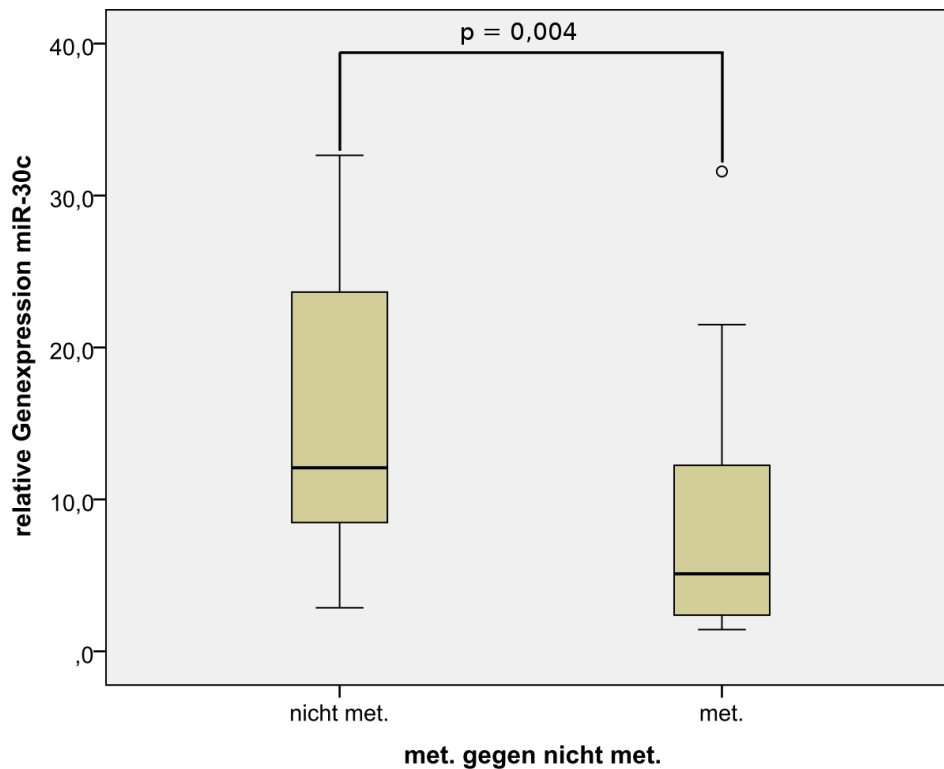
Hierbei konnten für die miRNAs miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 Expressionsunterschiede festgestellt werden. In der folgenden Tabelle (Tab. 9) sind die Signifikanzwerte und verringerte miRNA-Expression dargestellt. Die Abbildungen (Abb. 14 und 15) stellen für miR-26a und miR-30c beispielhaft die Verteilung der normalisierten CP-Werte in Form von Boxplots dar.

**Tabelle 9:** Erniedrigte Expression (Fold-Change) der untersuchten miRNAs in metastasierten Tumoren im Vergleich zu nicht metastasierten Tumoren mit den dazugehörigen Signifikanzwerten (p-Wert) und Abweichungen.

miRNA	p-Wert	Fold-Change	Abweichung
let-7a	0,131	Kein Unterschied	
let-7b	0,152	Kein Unterschied	
let-7c	0,347	Kein Unterschied	
miR-26a	0,025 *	-2,26	Std. Fehler -8,62 – 1,98
miR-30b	0,014 *	-2,36	Std. Fehler -8,47 – 1,54
miR-30c	0,004 **	-2,61	Std. Fehler -8,77 – 1,35
miR-125b	0,562	Kein Unterschied	
miR-145	0,036 *	-2,16	Std. Fehler -10,42 – 2,27



**Abbildung 14:** Verteilung der normalisierten CP-Werte von metastasierten gegen nicht metastasierte Tumoren für miRNA miR-26a (angereicherter miRNA).



**Abbildung 15:** Verteilung der normalisierten CP-Werte von metastasierten gegen nicht metastasierte Tumoren für miRNA miR-30c (angereicherter miRNA).

### 5.3 qPCR-Validierung von Gesamt-RNA nach der Trizolmethode

Weiterhin sollten die Microarraydaten unter Verwendung von Gesamt-RNA basierter qPCR geprüft werden, da bei Isolierungsmethoden, mit denen Gesamt-RNA gewonnen wird, der Verlust an miRNA geringer ist und weiterhin nur hier die Qualität messbar ist. (Podolska et al. 2011)

Für die Untersuchung der miRNA-Expression wurde Gesamt-RNA aus synchron metastasierten (n=5), spät metastasierten (n=10) und nicht metastasierten (n=6) klarzelligen NZK durch Trizol isoliert. Die qPCR wurde mit den Primern für let-7a, let-7b, let-7c, miR-26a und der Referenz RNU48 durchgeführt, da mit diesen bei der Microarray-Untersuchung die stärksten Unterschiede für verschiedene Metastasierungsgruppen beobachtet werden konnten. Bei der Auswertung wurden synchron metastasierte Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren, sowie synchron und spät metastasierte Tumoren gegen nicht metastasierte Tumoren ausgewertet. Bei keinem dieser Vergleiche ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Tumorguppen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 10 zusammengefasst.



**Tabelle 10:** Signifikanzwerte für die qPCR nach der Isolierung der Gesamt-RNA durch Trizol

	let-7a	let-7b	let-7c	miR-26a
Synchron metastasierte Tumoren gegen spät metastasierte und nicht metastasierte Tumoren	p=0,886	p=0,752	p=0,924	p=0,478
Synchron und spät metastasierte Tumoren gegen nicht metastasierte Tumoren	p=0,944	p=0,221	p=0,681	p=0,859

#### 5.4 qPCR-Validierung von Gesamt-RNA-Isolierung mit filterbasiertem Kitsystem

Eine weitere qPCR-Untersuchung wurde anhand von Gesamt-RNA, welche über ein spezielles Kitsystem isoliert wurde, durchgeführt. Für die Untersuchung der miRNA-Expression wurde Gesamt-RNA aus synchron metastasierten (n=10), spät metastasierten (n=10 für let-7c und miR-26a bzw. n=7 für miR-30c) und nicht metastasierten (n=10) klarzelligen NZK isoliert. Die qPCR wurde mit den Primern für let-7c, miR-26a, miR-30c und der Referenz RNU48 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach dem gleichen Schema wie dies bereits bei den durch Trizol isolierten Proben beschrieben wurde. Auch hier konnten keine Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Tumorguppen ermittelt werden (siehe Tab. 11).

**Tabelle 11:** Signifikanzwerte für die qPCR nach der Isolierung der Gesamt-RNA mit filterbasiertem Kitsystem.

	let-7c	miR-26a	miR-30c
Synchron metastasierte Tumoren gegen spät metastasierte und nicht metastasierte Tumoren	p=0,213	p=0,899	p=0,450
Synchron und spät metastasierte Tumoren gegen nicht metastasierte Tumoren	P=0,838	P=0,624	P=0,069

#### 5.5 Vergleich Gesamt-RNA mit filterbasiertem Kitsystem und angereicherter miRNA

Um Unterschiede zwischen den Isolierungsmethoden zu zeigen, wurden die Isolierungsmethode, bei der Gesamt-RNA mit filterbasiertem Kitsystem gewonnen wurde und die Isolierungsmethode, bei der angereicherte miRNA gewonnen wurde, verglichen. Diese beiden Methoden wurden gewählt, da beide über das gleiche Kitsystem durchgeführt werden

und sich somit nur durch den Anreicherungsschritt unterscheiden. Weiterhin ist die Verunreinigung der Gesamt-RNA bei der Methode mit Hilfe des filterbasierten Kitsystems geringer als dies bei der Isolierung durch Trizol der Fall ist. Für den Vergleich wurden die miRNAs miR-26a und miR-30c gewählt, da diese die höchsten Unterschiede in angereicherter miRNA gezeigt hatten. Für die Gegenüberstellung der beiden Verfahren wurden jeweils dieselben synchron metastasierten (n=3), spät metastasierten (n=3) und nicht metastasierten (n=3) Tumoren mit den zwei Isolierungsmethoden isoliert und anschließend eine qPCR durchgeführt. Bei der Isolierung mit angereicherter miRNA wurden signifikante Expressionsunterschiede von miR-26a und miR-30c zwischen synchron metastasierten Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren gemessen. Hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorgruppen bei der Verwendung der identischen Proben nach Gesamt-RNA-Isolierung gezeigt werden. Die anschließende Tabelle (Tab. 12) zeigt die erniedrigte Expression und die entsprechenden Signifikanzen bei Verwendung von angereicherter miRNA und die nicht signifikanten p-Werte bei Messung mit Gesamt-RNA.

**Tabelle 12:** MiRNA-Expressionsunterschiede zwischen synchron metastasierten Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren im Vergleich zwischen angereicherter miRNA und Gesamt-RNA. Bei der Gesamt-RNA zeigen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede.

miRNA	Angereicherte miRNA		Gesamt-RNA	
	p-Wert	Fold-Change	p-Wert	Fold-Change
miR-26a	<0,001	-8,1	0,969	-
miR-30c	0,024	-3,7	0,869	-

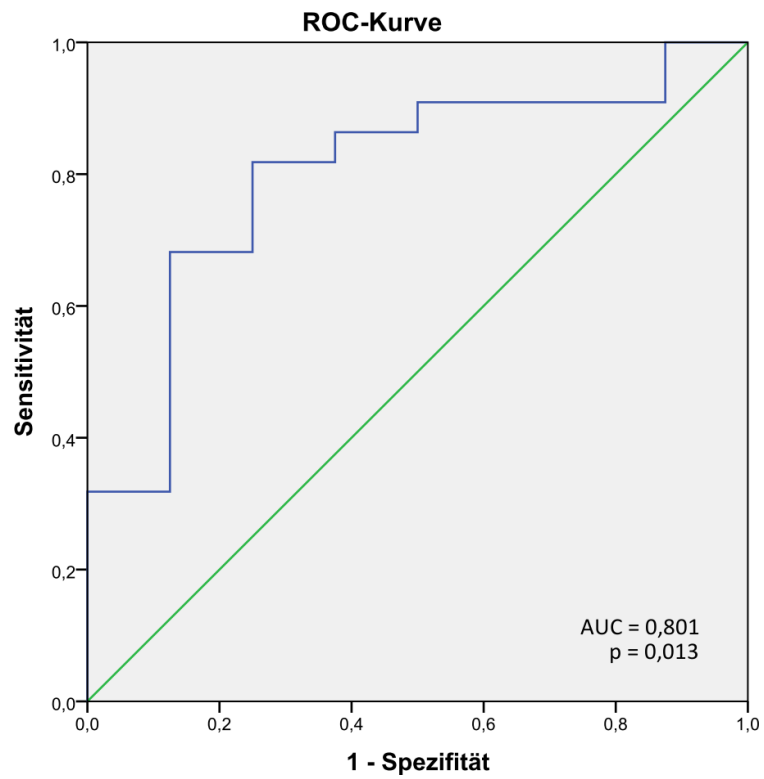
## 5.6 Receiver Operating Characteristic-Kurven und Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für angereicherte miRNA

Zunächst wurden mit Hilfe der ROC-Kurven Schwellenwerte festgelegt, welche anhand der entsprechenden miRNA-Expressionslevels synchron metastasierte Tumoren gut gegen spät und nicht metastasierte Tumoren unterscheiden, um hoch aggressive Tumoren abgrenzen zu können. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengestellt.

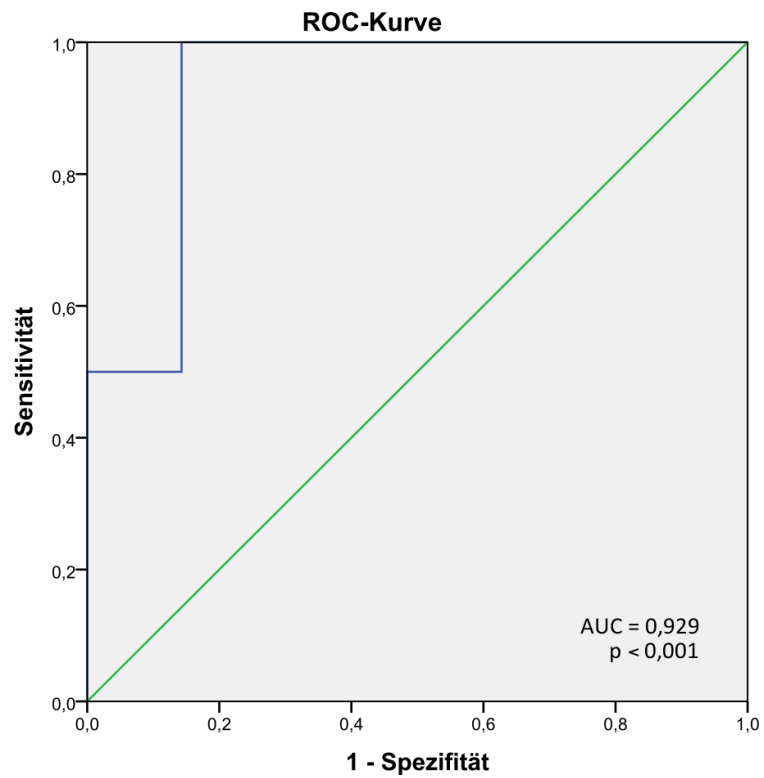
**Tabelle 13:** Durch die ROC-Kurven ermittelten Signifikanzwerte, Sensitivitäten und Spezifitäten bezüglich der Unterscheidung von synchron metastasierten Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren.

miRNA	Synchron metastasiert gegen spät und nicht metastasiert			
	AUC	p-Wert	Sensitivität	Spezifität
let-7a	0,841	0,005 **	86,4 %	75,0 %
let-7b	0,733	0,055	-	-
let-7c	0,801	0,013 *	81,8 %	75,0 %
miR-26a	0,929	0,001 **	100,0 %	85,7 %
miR-30b	0,844	0,007 **	81,8 %	71,4 %
miR-30c	0,883	0,003 **	86,4 %	86,7 %
miR-125b	0,740	0,059	-	-
miR-145	0,779	0,028 *	77,3 %	71,4 %

Hier sollen beispielhaft die ROC-Kurven für let-7c und miR-26a zur Unterscheidung synchron metastasierter Tumoren gegen spät und nicht metastasierter Tumoren gezeigt werden (Abb. 16 und 17).



**Abbildung 16:** ROC-Kurve für let-7c zur Unterscheidung von synchron metastasierten Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren.



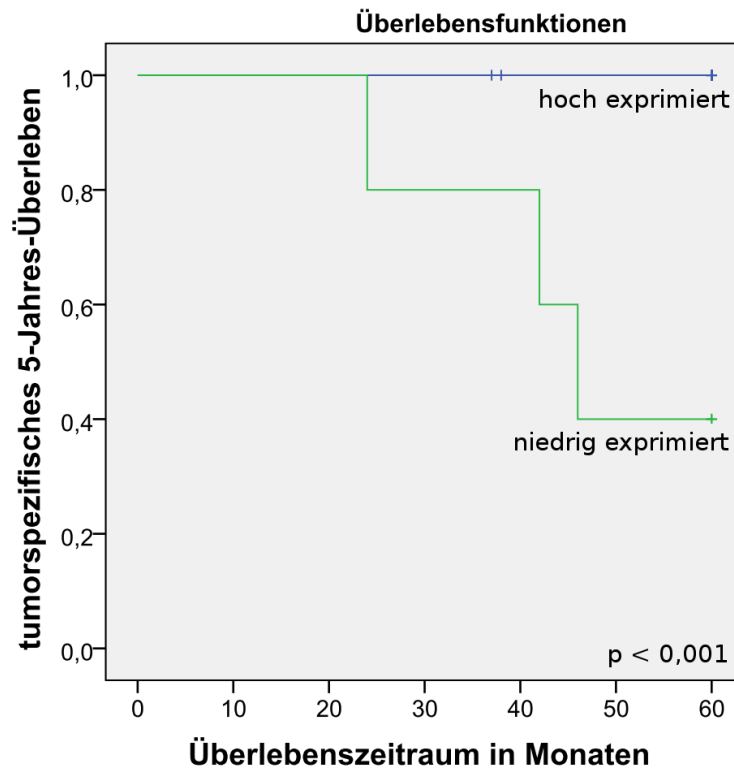
**Abbildung 17:** ROC-Kurve für miR-26a zur Unterscheidung von synchron metastasierten Tumoren gegen spät und nicht metastasierte Tumoren.

Anhand der Nachsorgedaten und der ROC-Kurven wurden Cut-Off-Werte, die zwischen den einzelnen Tumorgruppen gut unterscheiden, ermittelt. Mit Hilfe dieser Werte wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Hierbei wurde einerseits das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben betrachtet. Dabei wurden die synchron metastasierten Tumoren in diese Auswertung nicht mit einbezogen, da hier das Zielereignis bereits zu Beginn der Betrachtung eingetreten war. Weiterhin wurde das tumorspezifische 5-Jahres-Überleben der Patienten betrachtet. Anhand des Log-rank-Tests wurden die Überlebenskurven verglichen und die Signifikanz ermittelt (siehe Tab. 14). Es handelt sich aufgrund der betrachteten Probenanzahl nur um initiale Analysen.

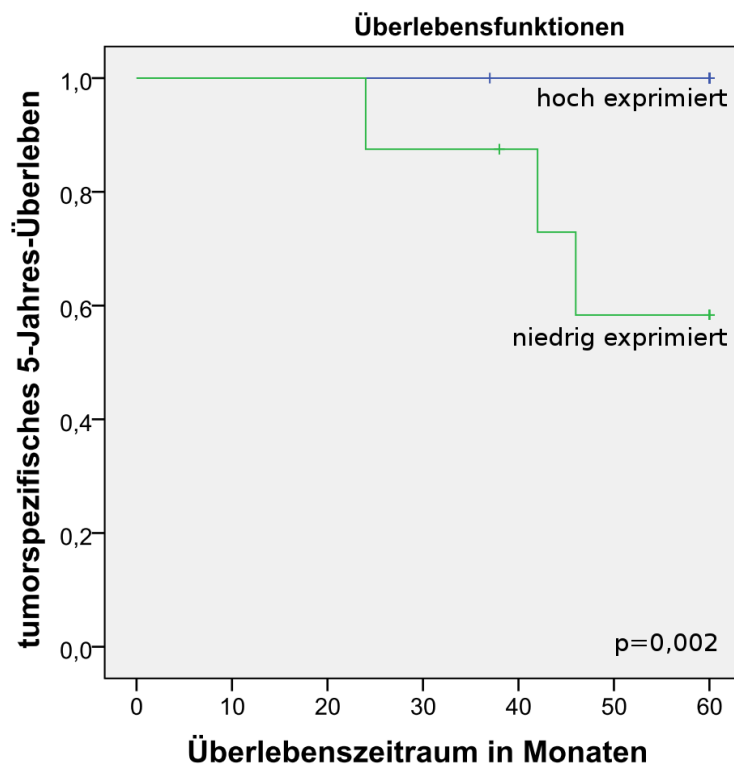
**Tabelle 14:** Ermittelte Signifikanzwerte für progressionsfreies 5-Jahres-Überleben und tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben im Vergleich der Überlebenskurven von hoch oder niedrig exprimierter miRNA anhand des Log-rank-Tests.

miRNA	Progressionsfreies 5-Jahres-Überleben p-Wert	Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben p-Wert
let-7a	0,225	0,019 *
let-7c	0,010 *	0,005 **
miR-26a	0,051	<0,001 ***
miR-30b	0,489	0,002 **
miR-30c	0,296	0,002 **

Hier sollen beispielhaft die Kaplan-Meier-Kurven für das tumorspezifische Überleben von miR-26a und miR-30c gezeigt werden (Abb. 18 und 19).



**Abbildung 18:** Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben für die Expression von miR-26a (hoch exprimiert n=22; niedrig exprimiert n=5).



**Abbildung 19:** Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben für die Expression von miR-30c (hoch exprimiert n=19; niedrig exprimiert n=8).

Das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben sinkt für let-7c von 94,1 % bei hoher Expression gegenüber 50 % bei niedriger Expression. Bezüglich der tumorspezifischen

5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit wird diese für let-7c von 100,0 % bei hoher Expression auf 63,5 % bei niedriger Expression gesenkt. Für miR-26a wird die tumorspezifische 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit um 60,0 %, für miR-30b als auch für miR-30c um 41,7 % bei erniedrigter Expression gesenkt.

Weiterhin sollten metastasierte von nicht metastasierten Tumoren anhand der miRNA-Expressionslevel unterschieden werden. Hierzu wurden ROC-Kurven erstellt (Tab. 15). Geeignet zur Unterscheidung dieser beiden Gruppen ist die Expression von miR-30c mit einer Sensitivität von 93,3 % und einer Spezifität von 64,3 %.

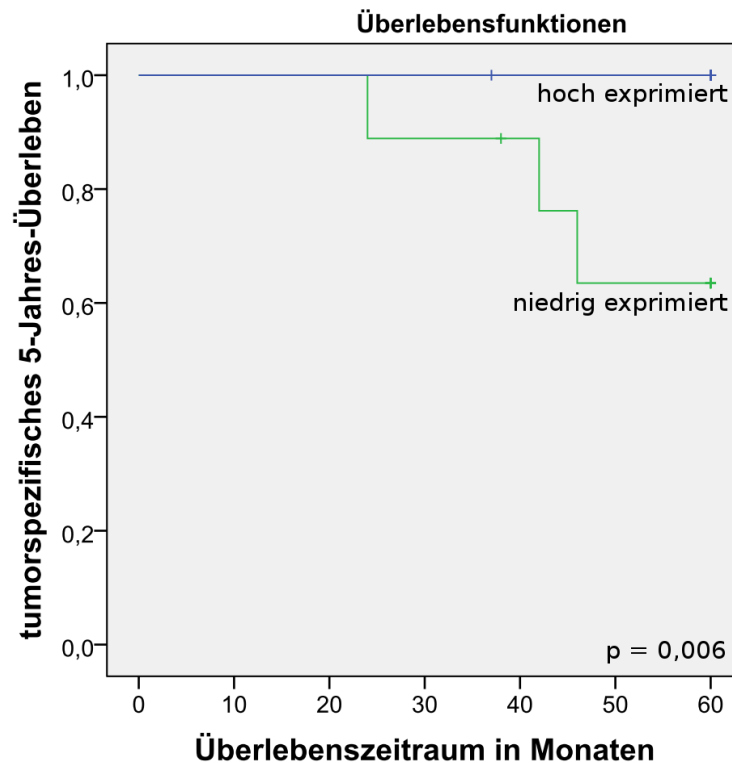
**Tabelle 15:** Durch die ROC-Kurven ermittelten Signifikanzwerte, Sensitivitäten und Spezifitäten bezüglich der Unterscheidung von metastasierten Tumoren gegen nicht metastasierte Tumoren.

miRNA	Metastasiert gegen nicht metastasiert			
	AUC	p-Wert	Sensitivität	Spezifität
let-7a	0,658	0,141	-	-
let-7b	0,644	0,178	-	-
let-7c	0,627	0,237	-	-
miR-26a	0,710	0,055	-	-
miR-30b	0,719	0,045 *	80 %	57,1 %
miR-30c	0,762	0,016 *	93,3 %	64,3 %
miR-125b	0,519	0,861	-	-
miR-145	0,638	0,206	-	-

Die Unterschiede der Kaplan-Meier-Kurven für progressionsfreies und tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben waren nur für miR-30c signifikant (Tab. 16). Hier soll die Kaplan-Meier-Kurven für das tumorspezifische 5-Jahres-Überleben von miR-30c gezeigt werden (Abb. 20).

**Tabelle 16:** Ermittelte Signifikanzwerte für progressionsfreies 5-Jahres-Überleben und tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben im Vergleich der Überlebenskurven von hoch oder niedrig exprimierter miR-30c anhand des Log-rank-Test

miRNA	Progressionsfreies 5-Jahres-Überleben p-Wert	Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben p-Wert
miR-30c	0,010 *	0,006 **



**Abbildung 20:** Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben für die Expression von miR-30c (hoch exprimiert n=9; niedrig exprimiert n=18).

Das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben sinkt für miR-30c von 94,1 % bei hoher Expression gegenüber 50 % bei niedriger Expression. Bezüglich der tumorspezifischen 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit wird diese für miR-30c von 100,0 % bei hoher Expression auf 63,5 % bei niedriger Expression gesenkt.

## 5.7 Funktionelle Analysen

In funktionellen Analysen sollte der Einfluss von let-7c auf Proliferation, Migration und Invasion von Zellen untersucht werden. Die durchgeführten Expressionsanalysen an angereicherter miRNA und erstellten Überlebenskurven zeigten, dass diese miRNA-Expression mit der Metastasierung des klarzelligen NZK assoziiert sein könnte. Somit wurde eine Prüfung des funktionellen Zusammenhanges durchgeführt. Hierfür wurde die miRNA in der Nierenzelllinie 786-O inhibiert oder aktiviert und anschließend wurden die funktionellen Analysen durchgeführt.



### 5.7.1 Vorversuche Zellkultur

Zunächst wurden Wachstumskurven für die Zelllinie 786-O in den einzelnen später verwendeten Well-Platten erstellt, um die jeweils geeignete Zellzahl für die anschließenden Experimente zu bestimmen. Die Zellen wurden hierfür in unterschiedlichen Zellzahlen ausgesät und ihre Konfluenz (Zelldichte) nach 12 h bzw. 24 h mit einem Mikroskop bestimmt (Tab. 17). Eine geeignete Zellzahl sollte eine Konfluenz von 90 % zum Ende des Zeitraumes nicht überschreiten.

**Tabelle 17:** Zelldichte von 786-O in 96-, 24- und 6-Well-Platten. Die Zellzahl bezeichnet die eingesetzten Zellen. Mitte und Rand des Wells werden in 24- und 6-Well-Platten unterschieden, da sich hier deutlich unterschiedliche Konfluenzen zeigten. Die fett gedruckten Zellzahlen wurden für nachfolgende Versuche verwendet.

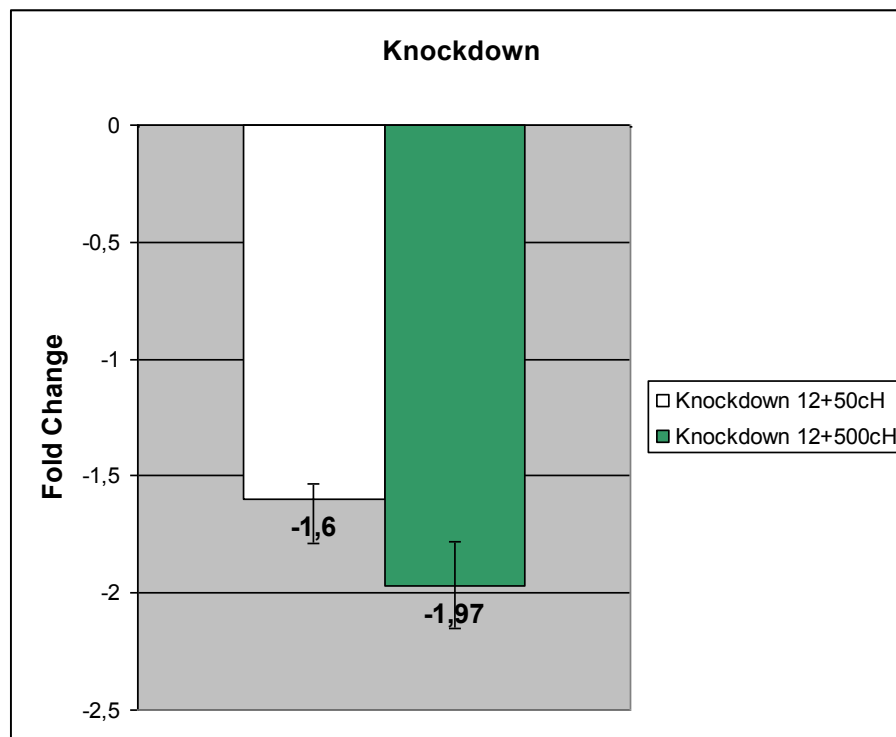
96-Well-Platte		
Zellzahl	24h	
1000	<5 %	
2000	10 %	
5000	40 %	
7500	50 %	
<b>10000</b>	80 %	
12500	90 %	
15000	100 %	
20000	100 %	
24-Well-Platte		
Zellzahl	12h	
	Mitte	Rand
50000	100 %	50 %
60000	100 %	60 %
<b>70000</b>	100 %	80 %
80000	100 %	
6-Well-Platte		
Zellzahl	24h	
	Mitte	Rand
25000	40-50 %	<5 %
50000	60 %	<5 %
75000	60-70 %	10 %
100000	90 %	10 %
150000	100 %	30 %
<b>200000</b>	90 %	40-50 %
250000	100 %	75 %
300000	100 %	70 %
400000	100 %	90 %
500000	100 %	
600000	100 %	

Für die Transfektion der Zellen wurden diese in einer Zellzahl von 200.000 in 6-Well-Platten ausgesät. Für die Proliferationsassays wurden 10.000 Zellen in einer 96-Well-Platte für 24 h verwendet. Für die Migrations- und Invasionsassays wurden 24-Well-Platten mit 70.000 Zellen verwendet.

### 5.7.2 Konzentration Mimic und Inhibitor

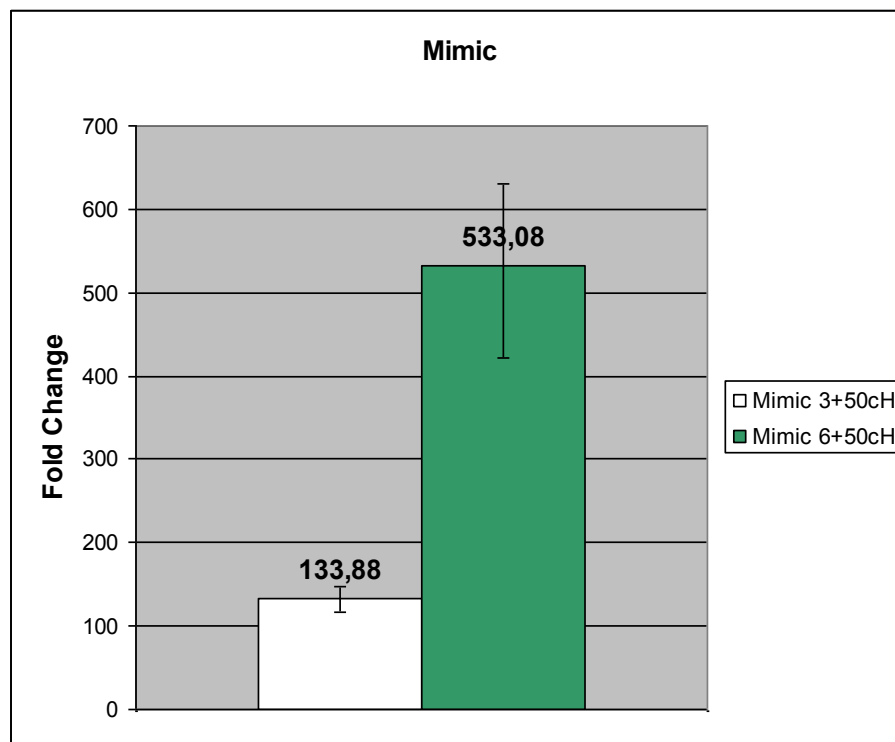
Für die Etablierung des Mimics und des Knockdowns wurden zu den Zellen verschiedene Konzentrationen des miRNA-Mimics bzw. Inhibitors und von Transfektionsreagenz (HiPerfect) gegeben. Die Konzentrationen, welche die effektivsten Erhöhungen bzw. Erniedrigungen der miRNA erbrachten, wurden in einem dreifachen Ansatz auf ihre Stabilität getestet.

Für den Knockdown wurden die Konzentrationen 12+50cH und 12+500cH getestet, wobei sich für die Konzentration 12+500cH die effektivere und stabilere Inhibition der miRNA ergab, so dass diese auch für die Assays verwendet wurde. Die Auswertung unter Verwendung der REST-Software ergab eine signifikante Erniedrigung der miRNA-Konzentration durch die Zugabe von 12+500cH im Mittelwert um -1,97 (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Darstellung der Erniedrigung der Konzentration von let-7c durch Zugabe von Knockdown 12+50cH und 12+500cH.

Für den Mimic wurden die Konzentrationen 3+50cH und 6+50cH getestet, wobei sich herausstellte, dass der Mimic mit 6+50cH eine effektivere Erhöhung der miRNA-Konzentration im Mittelwert um 533,08 ergab. Der Mimic mit 3+50cH ergab eine Erhöhung im Mittelwert um 133,88. Da dieser Fold Change bereits eine enorme Erhöhung der miRNA bedeutete und eine gute Balance zwischen Toxizität des Transfektionsreagenz und gutem Effekt des Mimics erreicht werden sollte, wurde für die Versuche bezüglich Proliferation, Invasion und Migration der Mimic mit der Konzentration 3+50cH ausgewählt (Abb. 22).



**Abbildung 22:** Darstellung der Erhöhung der Konzentration von let-7c durch Zugabe von Mimic 3+50cH und 6+50cH.

### 5.7.3 Spezifität der Transfektion

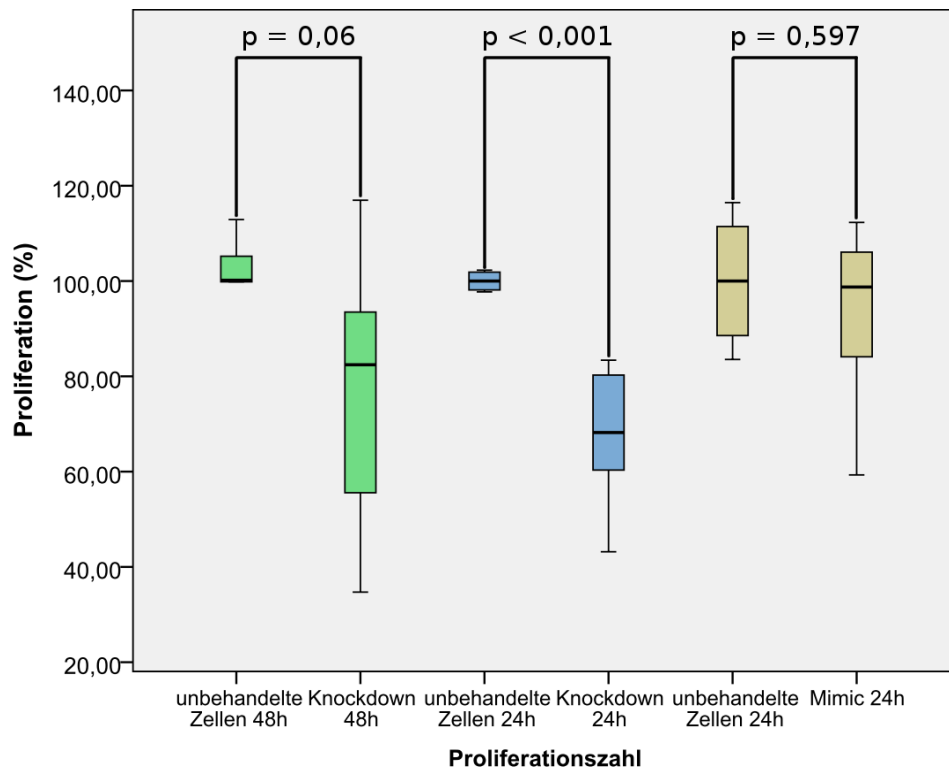
Für die Überprüfung der Spezifität der Transfektion wurden die miRNA-Expression für die miRNA let-7c in unbehandelten Zellen sowie Zellen (Mock), welche ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden und Zellen, welche sowohl mit der miRNA-Komponente als auch mit Transfektionsreagenz behandelt wurden, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in Zellen, welche ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden sind, keine Veränderung der zu untersuchenden miRNA ergab (Daten nicht gezeigt).

### 5.7.4 Proliferation

Die Proliferationsaktivität der Zellen wurde mit WST-1 bestimmt, welches durch die Zellen in Formazan umgesetzt wurde. Das gebildete Formazan wurde anschließend absorptionsphotometrisch bestimmt.

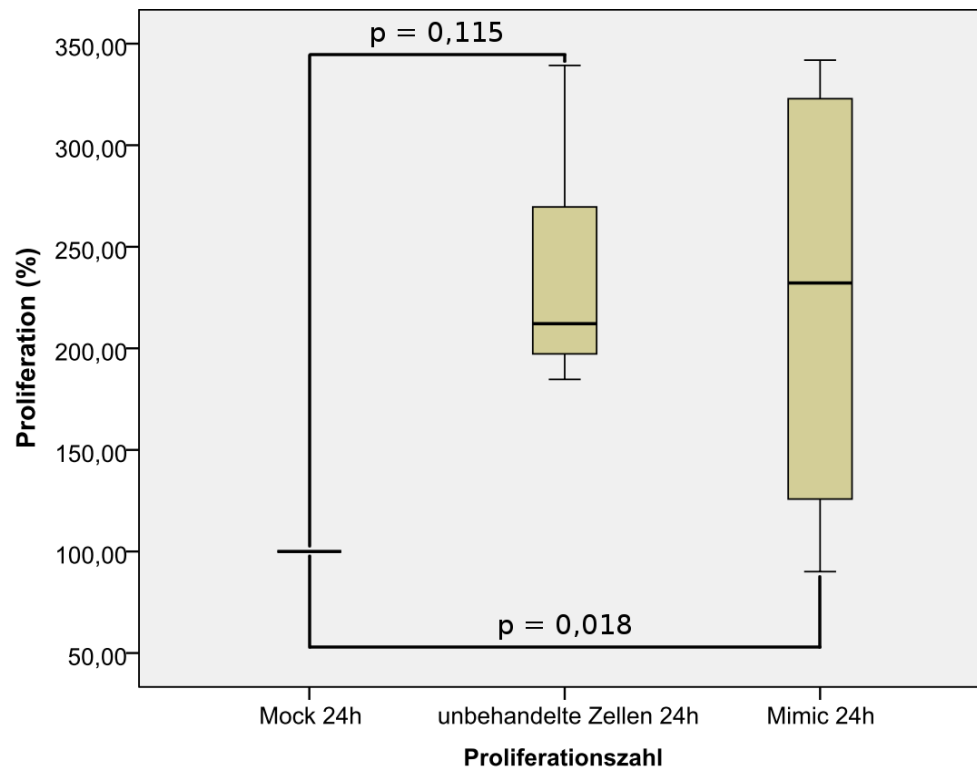
Für die Proliferationsassays wurden unbehandelte Zellkulturen (n=9) und mit Inhibitor versetzte Zellkulturen (n=10) nach 48 h verglichen. Weiterhin wurden unbehandelte Zellkulturen (n=7) und mit Inhibitor versetzte Zellkulturen (n=8) nach 24 h verglichen. Bezüglich der Überexpression wurden unbehandelte Zellkulturen (n=10) und mit Mimic (n=10) versetzte Zellkulturen nach 24 h verglichen.

Anhand der Konzentrationen des Formazans zeigten sich in der anschließenden Auswertung unter Verwendung von SPSS verringerte Proliferationszahlen durch Knockdown im Vergleich zu unbehandelten Zellen sowohl nach 24 h um 31,80 % ( $p=0,001$ ) als auch nach 48 h um 17,57 % ( $p=0,06$ ). Keine Veränderung der Proliferation konnte durch mit Mimic versetzten Zellkulturen hervorgerufen werden ( $p=0,597$ ) (Abb. 23).



**Abbildung 23:** Darstellung der Proliferation von unbehandelten Zellen und mit Inhibitor versetzten Zellen nach 48 h und von unbehandelten Zellen, mit Inhibitor und mit Mimic versetzten Zellen nach 24 h.

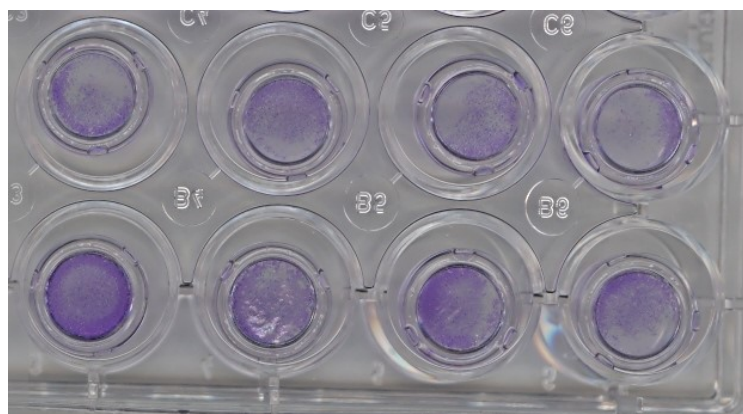
Da davon ausgegangen wurde, dass das Transfektionsreagenz das Verhalten der Zellen nicht beeinträchtigt, wurde zunächst angenommen, dass es ausreichend ist, die unbehandelten Zellen als Kontrolle zu verwenden. In späteren Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass bereits durch Zugabe des Transfektionsreagenz eine verringerte Proliferation hervorgerufen wurde. Hier zeigte sich beim Vergleich von unbehandelten Zellkulturen ( $n=10$ ), mit Mimic versetzten Zellkulturen ( $n=10$ ) und mit  $3\ \mu\text{l}$  Transfektionsreagenz versetzten Zellkulturen (Mock,  $n=3$ ) nach 24 h ein Unterschied in der Proliferation. Durch die alleinige Zugabe des Transfektionsreagenz verringerte sich die Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen. In unbehandelten Zellkulturen war die Proliferation im Vergleich zu mit  $3\ \mu\text{l}$  Transfektionsreagenz versetzten Zellkulturen von 100 % auf 232,18 % erhöht, aufgrund der geringen Probenzahl allerdings nur tendenziell verändert ( $p=0,115$ ). In mit Mimic versetzten Zellkulturen war die Proliferation auf 212,14 % erhöht im Vergleich mit Transfektionsreagenz versetzten Zellen ( $p=0,018$ ) (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Darstellung der Proliferation von mit Transfektionsreagenz versetzten Zellen (Mock), unbehandelten Zellen und mit Mimic versetzten Zellen nach 24 h.

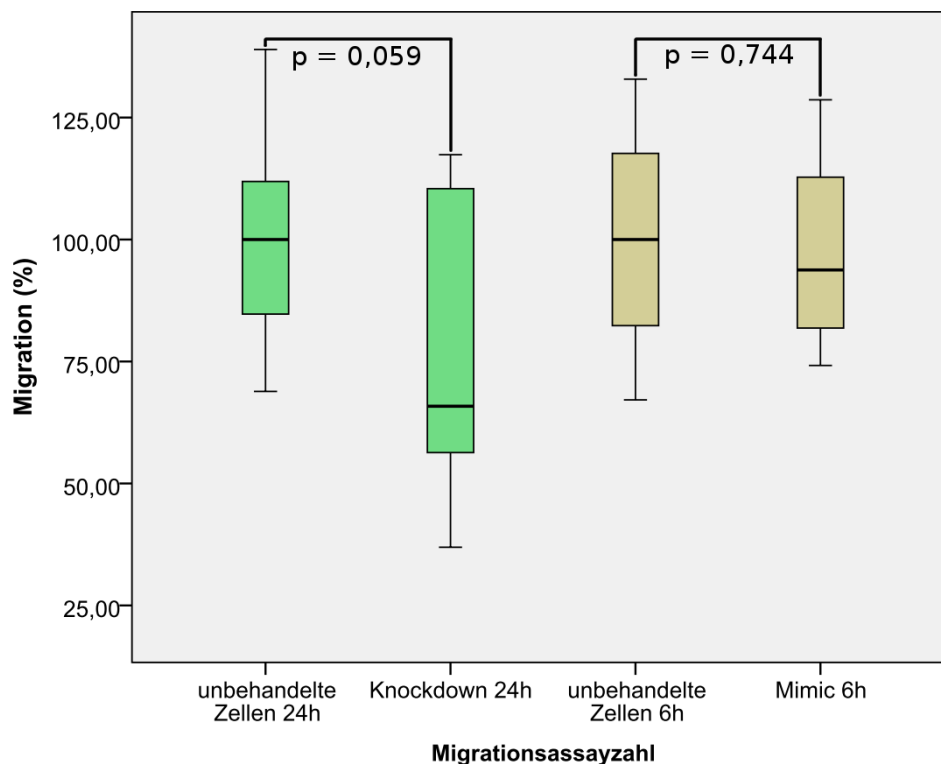
### 5.7.5 Migration

Für die Migration wurden die Zellen in Transwell-Systemen kultiviert, durch die die Zellen anhand eines Konzentrationsgefälles von FKS migrieren sollten. Anschließend erfolgte die Färbung der migrierten Zellen durch Kristallviolett (Abb. 25).



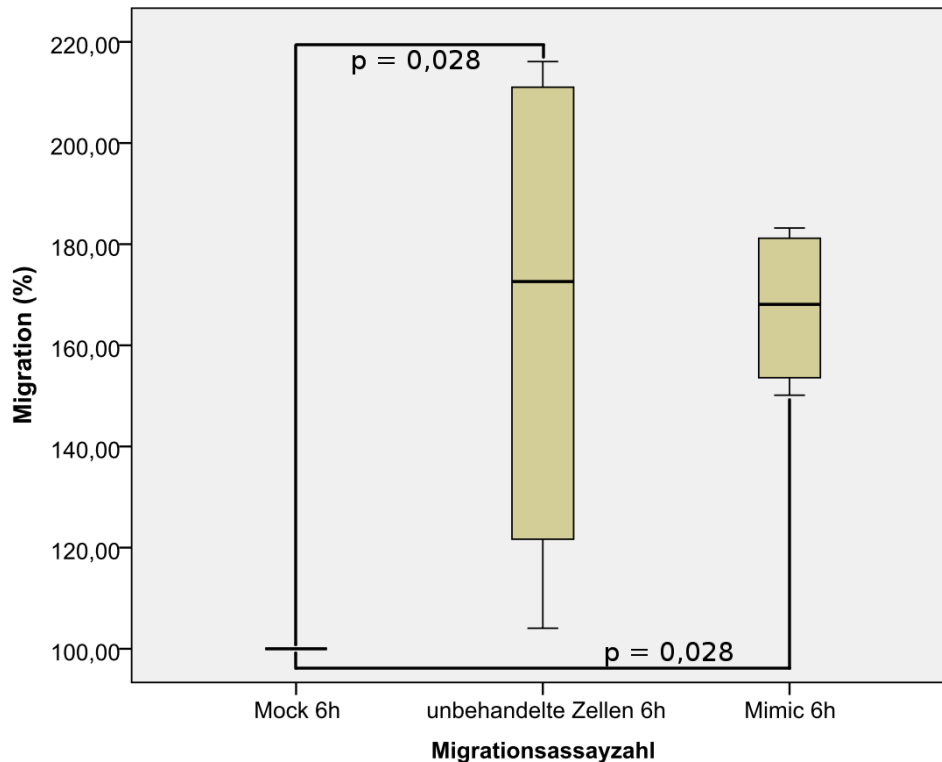
**Abbildung 25:** Inserts nach einem Migrationsassay mit durch Kristallviolett angefärbten Zellen. In der oberen Reihe befinden sich mit Inhibitor versetzte Zellen, in der unteren Reihe unbehandelte Zellen.

Für die Migration wurden jeweils unbehandelte (n=10) bzw. mit Inhibitor versetzte Zellkulturen (n=10) nach 24 h und unbehandelte (n=10) bzw. mit Mimic versetzte Zellkulturen (n=10) nach 6 h verglichen. Die Zeitunterschiede erklären sich durch die unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit von mit Mimic bzw. Inhibitor versetzten Zellen. Anhand der gemessenen Konzentrationen des Kristallvioletts wurde die Migrationsfähigkeit der einzelnen Transfektionsansätze verglichen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Darstellung der Migration von unbehandelten Zellen und mit Inhibitor versetzten Zellen nach 24 h und von unbehandelten Zellen und mit Mimic versetzten Zellen nach 6 h.

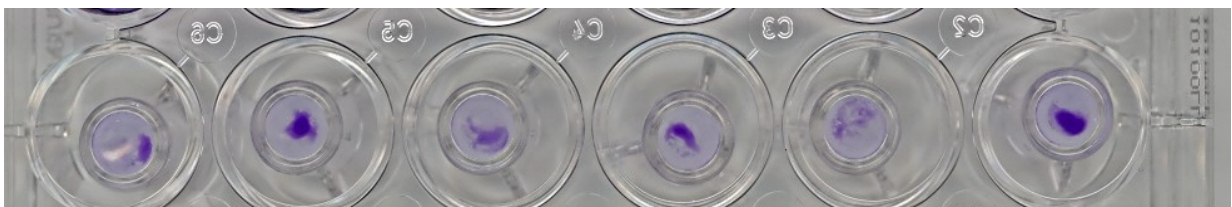
Allerdings konnte auch bei diesen Versuchen wieder nachgewiesen werden, dass bereits durch die Zugabe des Transfektionsreagenz die Migration beeinträchtigt wird. Es wurden unbehandelte Zellkulturen (n=4), mit Mimic versetzte Zellkulturen (n=4) und mit 3 µl HiPerfekt versetzte Zellkulturen (n=3) nach 6 h verglichen (Abb. 27). Unbehandelte Zellkulturen migrierten von 100 % auf 172,6 % (p=0,028) stärker als mit Transfektionsreagenz versetzte Zellen. Mit Mimic versetzte Zellkulturen migrierten stärker (168,1 %, p=0,028) als mit Transfektionsreagenz versetzte Zellen.



**Abbildung 27:** Darstellung der Migration von mit Transfektionsreagenz versetzten Zellen (Mock), unbehandelten Zellen und mit Mimic versetzten Zellen nach 6 h.

### 5.7.6 Invasion

Die Invasionsassays wurden nach dem gleichen Prinzip wie die Migrationsassays durchgeführt. Allerdings waren die hier verwendeten Transwell-Systeme zusätzlich mit Matrigel beschichtet. Die Auswertung erfolgte wiederum anhand der gemessenen Konzentrationen des Kristallvioletts (Abb. 28).

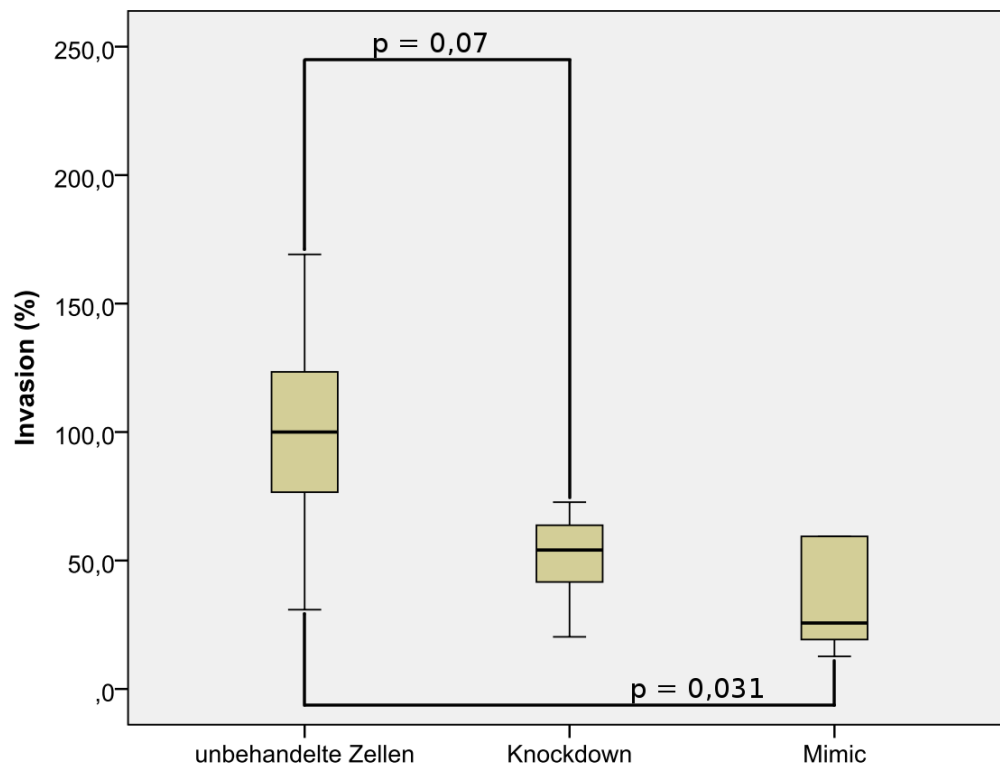


**Abbildung 28:** Inserts nach einem Invasionsassay mit durch Kristallviolett angefärbten Zellen. Von links nach rechts je zwei Inserts mit unbehandelten Zellen, mit Inhibitor versetzte Zellen und mit Mimic versetzte Zellen.

Für die Invasion wurden jeweils unbehandelte (n=12), mit Inhibitor versetzte (n=6) und mit Mimic versetzte Zellkulturen (n=6) nach 24 h verglichen. Es zeigte sich eine verminderte Invasion in mit Inhibitor versetzten Zellkulturen um 45,92 % (p=0,07) und mit Mimic

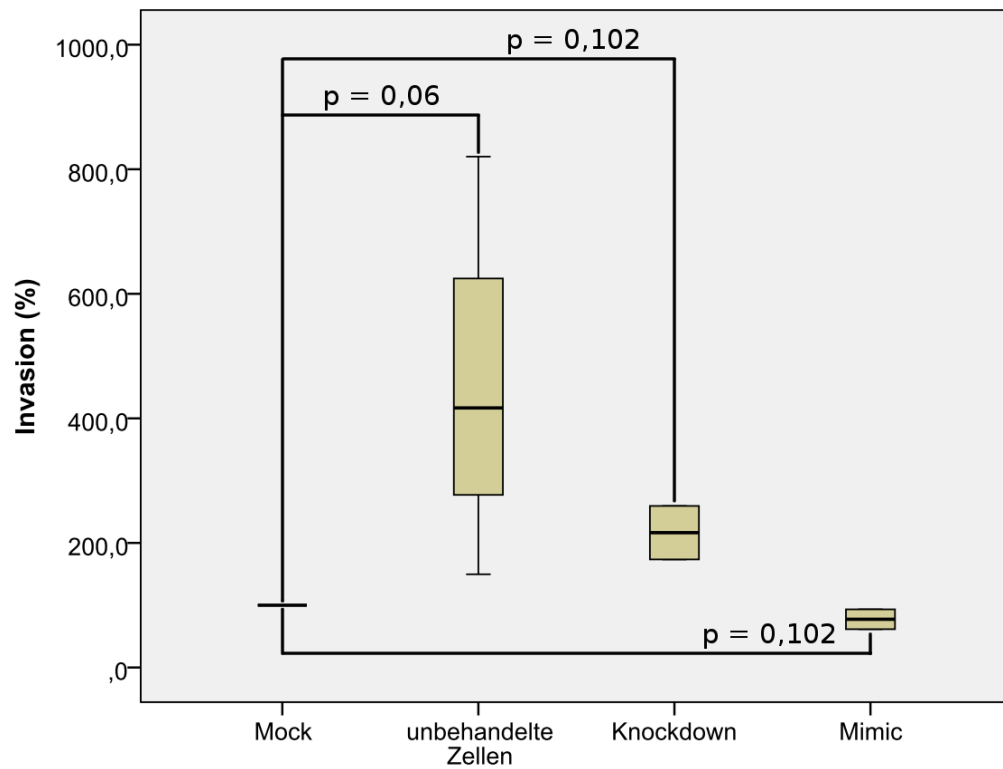


versetzten Zellkulturen um 74,33 % ( $p=0,031$ ) im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Darstellung der Invasion von unbehandelten Zellen, mit Inhibitor versetzten und mit Mimic versetzten Zellen nach 24 h.

Allerdings zeigte sich auch bei der Invasion wieder eine Beeinträchtigung durch die Zugabe des Transfektionsreagenz. Unbehandelte Zellkulturen invadierten im Vergleich zu mit Transfektionsreagenz versetzten Zellen von 100 % auf 416,77 % ( $p=0,06$ ) stärker. Eine tendenziell stärkere Invasion gab es bei mit Inhibitor versetzten Zellen auf 216,46% ( $p=0,102$ ), ebenso bei den mit Mimic versetzten Zellen um 22,55 % ( $p=0,102$ ) im Vergleich zu mit Transfektionsreagenz versetzten Zellkulturen (Abb. 30).



**Abbildung 30:** Darstellung der Invasion von mit Transfektionsreagenz versetzten Zellen (Mock), unbehandelten Zellen und mit Inhibitor und mit Mimic versetzten Zellen nach 24 h.

## 6. Diskussion

Für eine individuelle Nachsorge- und Therapieplanung ist die Prognosebewertung für den einzelnen Patienten essentiell. Insbesondere das Auftreten von Metastasen verschlechtert die 5-Jahres-Überlebensrate beim NZK drastisch. Somit ist es wichtig, Prognosemarker zu etablieren, welche das Metastasierungspotenzial voraussagen können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Biomarker zu etablieren, welche zur Vorhersage über die Metastasierung beim klarzelligen NZK geeignet sind. Biomarker können auf verschiedenen molekularbiologischen Ebenen identifiziert werden. Fokus der vorliegenden Arbeit waren die nichtkodierenden miRNAs.

### 6.1 Diskussion der qPCR-Ergebnisse

Aufbauend auf vorangegangenen Microarray-Analysen sollten miRNAs validiert werden, welche es erlauben, zwischen synchron und spät metastasierten und nicht metastasierten Tumoren zu differenzieren. Synchron metastasierte Tumore sind aus klinischer Sicht die aggressivsten Tumoren mit der schlechtesten Prognose, so dass es essentiell ist, diese frühzeitig zu identifizieren.

MiRNAs spielen eine Rolle bei den verschiedenen Schritten der Metastasierung, so dass sie für diesen Prozess potentielle Biomarker darstellen (Nicoloso et al. 2009). So konnte für diverse Tumorentitäten nachgewiesen werden, dass die miRNA-Expression mit Metastasierung und Überleben korreliert. Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die miRNA-Expression mit Metastasierung assoziiert ist. So sind beim metastasierten Mammakarzinom die miRNAs miR-10b, miR-373 und miR-520c hochreguliert und die miRNAs miR-146a, miR-146b und miR-335 herunterreguliert (Edmonds et al. 2009). Für nichtkleinzellige Bronchialkarzinome konnte beschrieben werden, dass eine verminderte Expression von let-7 zu einer signifikant schlechteren Prognose nach einer potentiell kurativen Resektion des Tumors führt (Takamizawa et al. 2004). Eine weitere Arbeit legte dar, dass in hepatozellulären Tumoren eine erniedrigte Expression von miR-122 mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert ist (Tsai et al. 2009). Diese verschiedenen Ergebnisse zeigen aber auch, dass die miRNA-Expression spezifisch für die unterschiedlichen

Tumorentitäten und Gewebe ist, so dass es notwendig ist, den Einfluss von miRNAs bei der Metastasierung des klarzelligen NZK zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand filterbasierter Isolierung von angereicherter miRNA und anschließender qPCR erstmals gezeigt, dass eine unterschiedliche Expression vorselektierter miRNAs in synchron, spät und nicht metastasierten klarzelligen NZK vorhanden ist. Unabhängig vom Metastasierungszeitpunkt können die miRNAs miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren unterscheiden, da sie in metastasierten Tumoren niedriger exprimiert sind. Die miRNAs let-7a, -b, -c, miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 sind in aggressiven synchron metastasierten Tumoren deutlich niedriger exprimiert als in spät und nicht metastasierten Tumoren.

In Hinblick auf die Prognose der Patienten wurden Kaplan-Meier-Kurven bezüglich des progressionsfreien-5-Jahres-Überlebens und des tumorspezifischen-5-Jahres-Überlebens erstellt. Hierbei zeigte sich, dass eine erniedrigte Expression von let-7c mit einem verkürzten progressionsfreien-5-Jahres-Überleben korreliert. Eine erniedrigte Expression von let-7a, let-7c, miR-26a, miR-30b und miR-30c korreliert mit einem verkürzten tumorspezifischen-5-Jahres-Überleben. Die untersuchten miRNAs können somit als potentielle Prognosemarker fungieren. Sie müssen jedoch noch an größeren Patientenkohorten getestet werden. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass hier ein selektiertes Patientengut untersucht wurde. So waren Patienten mit einer späten Metastasierung eingeschlossen, bei denen die Metastasierung frühestens nach 30 Monaten auftrat, Patienten mit früher metachroner Metastasierung sind nicht berücksichtigt worden. Für nachfolgende Studien sollten zur Prüfung der Relevanz dieser Marker konsekutive Serien verwendet werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beziehen sich publizierte Untersuchungen bezüglich der miRNA-Expression in NZK größtenteils auf die Unterscheidung zwischen Normalgewebe und Karzinomgewebe bzw. auf die Unterscheidung der einzelnen Subtypen. Diese Arbeiten zeigen sehr kontroverse Ergebnisse und nur wenige Überschneidungen. Verhältnismäßig häufig wurde die Herunterregulation von miR-141 und miR-200c beschrieben. Die Ursache für die differierenden Ergebnisse und die vielen verschiedenen miRNAs, die in diesen Studien gefunden wurden, liegt vor allem an den unterschiedlichen Vorgehensweisen. Es handelt sich um heterogene Patientenkohorten, es wurde z.B. nicht zwischen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren unterschieden. Wie die vorliegende Arbeit allerdings zeigen konnte,

ruft bereits diese Tatsache Unterschiede in den miRNA-Expressionsprofilen hervor. Weiterhin wurden unterschiedliche Isolierungsverfahren bzw. Analyseverfahren benutzt.

Nur wenige Untersuchungen beschäftigen sich bisher mit der miRNA-Expression und dem damit verbundenen Metastasierungspotenzial bzw. der damit assoziierten Prognose in NZK. Neben der Veränderung zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe detektierten Slaby et al. auch eine miRNA, die als potentieller Marker für metastasierte klarzellige NZK gelten kann. Dabei wurden an Tumorgeweben (n=38) und Normalgeweben (n=10) miRNAs, welche durch Microarrayanalysen vorselektiert wurden, anhand qPCR untersucht. Die Untersuchungen fanden an GesamtRNA, welche filterbasiert isoliert wurde, statt. Dabei fanden sich vier hochregulierte (miR-155, miR-210, miR-106a und miR-106b) und zwei herunterregulierte miRNAs (miR-141 und miR-200c). Weiterhin zeigte sich, dass miR-106b in metastasierten Tumoren, herunterreguliert ist. Die Expression von miR-106b ist in Tumoren mit einer besseren Prognose hochreguliert (Slaby et al. 2010). Diese Studie hat ebenfalls in Form der Deregulation von miR-106b einen Hinweis darauf gefunden, dass miRNAs nicht nur eine Bedeutung bei der Entstehung von NZK besitzen, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von Metastasen spielen. In der Studie wird die Hypothese aufgestellt, dass eine hohe miR-106b Expression den prometastatischen TGF- $\beta$ -(*Transforming growth factor  $\beta$* )-Signalweg unterdrückt (Slaby et al. 2010).

Eine weitere Studie, die sich mit der miRNA-Expression im metastasierten NZK auseinandersetzt, stammt von White et al.. Hierbei wurden primäre klarzellige NZK (n=18 frisch gefrorenes Gewebe und n=40 Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe) und Metastasen von NZK (n=10 frisch gefrorenes Gewebe und n=40 Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe) verglichen. Es wurden 9 hochregulierte miRNAs (z.B. miR-638, miR-1915 und miR-149) und 56 herunterregulierte miRNAs (z.B. miR-10b, miR-196a und miR-27b) gefunden. Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit konnte in dieser Studie ebenfalls eine Herunterregulierung der miRNAs let-7b, let-7c, miR-26a und miR-30c festgestellt werden. Allerdings ist zu beachten, dass es sich dabei um die Untersuchung der Metastasen handelt. Es ist davon auszugehen, dass sich die miRNA-Expression zwischen Primärtumoren und Fernmetastasen ebenfalls unterscheidet. Weiterhin wurde in dieser Studie die Auswirkung einer Inhibition von miR-215 in der Zelllinie 786-O untersucht. Eine Überexpression von miR-215 verringerte die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen (White et al. 2011b).

Wu et al. demonstrierten in ihrer Studie, dass das Risiko für die Metastasierung und die Prognose der Patienten mit der Expression von miRNA assoziiert ist. In 28 Proben aus

Tumorgewebe mit dem Tumorstadium T1 (n=13 ) und aus metastasiertem Tumorgewebe (M1, n=15) konnten anhand von Microarrayanalysen sieben hochregulierte und 14 herunterregulierte miRNAs detektiert werden. Aus diesen wurden die miRNAs miR-10b, miR-139-5p, miR-130b und miR-199b-5p selektiert, um an 40 Proben mit verschiedenen Tumorstadien eine Einordnung in Hoch- oder Niedrigrisikogruppen vorzunehmen. Dabei konnten 22 von 29 Proben mit Metastasierung in eine Hochrisikogruppe eingeordnet werden und sechs von sechs Proben ohne Metastasierung in eine Niedrigrisikogruppe. Diese Untersuchung zeigt, dass beim metastasierten NZK miRNAs als prognostische Biomarker geeignet sein können. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit wurden in der Publikation von Wu et al. auch einer Herunterregulation von miR-30a, miR-30c und miR-145 in metastasierenden Tumoren gefunden (Wu et al. 2012).

Wotschofsky et al. untersuchten Normalgewebe, Tumorgewebe und Knochenmetastasen von klarzelligen NZK. Dabei detektierten sie eine stufenweise Herunterregulation der miRNAs. Im Vergleich zu Normalgewebe waren im Tumorgewebe 23 miRNAs herunterreguliert. Darunter beispielhaft miR-10b, miR-143, miR-145 und miR-200c. Im Vergleich zwischen Tumorgewebe und Metastasengewebe waren ebenfalls 21 miRNAs herunterreguliert (Wotschofsky et al. 2012).

Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit konnte in diesen Studien, welche sich mit metastasierten NZK beschäftigt haben, gezeigt werden, dass miRNAs potentielle Biomarker sein können, und dass in aggressiven Tumoren miRNAs vor allem herunterreguliert sind. Die gefundenen miRNAs stimmen nur teilweise überein. Dies könnte möglicherweise durch unterschiedliche Materialien (z.B. Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe und Metastasen bei White et al.) oder andere Isolierungsmethoden (Gesamt-RNA bei Slaby et al.) bedingt sein.

Die in dieser Arbeit validierten miRNAs waren alle in metastasierten NZK im Vergleich zu nicht metastasierten NZK herunterreguliert. Lu et al. stellten in ihrer Studie fest, dass die miRNA-Expression in Tumorgewebe herunterreguliert ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Höhe der generellen miRNA-Expression im Zusammenhang mit dem Zustand der Differenzierung des Tumors steht. Je weniger miRNAs exprimiert werden, desto undifferenzierter sind die Tumorzellen (Lu et al. 2005). Kumar et al. stellten sich die Frage, ob die niedrige miRNA-Expression die Entdifferenzierung bedingt oder ob durch die Entdifferenzierung die niedrige miRNA-Expression hervorgerufen wird. Um dies zu untersuchen, wurde die Biogenese der miRNAs gehemmt und damit eine geringe Konzentration an miRNAs hervorgerufen. Die so veränderten Tumorzellen neigten zu einer

stärkeren Entdifferenzierung. Eine Inhibition der miRNA in Tumoren im Tiermodell begünstigte eine verstärkte Motilität und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen (Kumar et al. 2007). Diese Studien unterstützen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass in aggressiven, wenig differenzierten, metastasierten NZK die miRNA-Expression herunterreguliert ist. Die verstärkte Migrations- und Invasionsfähigkeit durch herabregulierte miRNAs begünstigt die Entstehung von Metastasen.

In anderen metastasierten Tumorarten wurden die in dieser Arbeit identifizierten miRNAs und ihre Rolle bei der Metastasierung bereits nachgewiesen.

Viele Untersuchungen existieren zur let-7-Familie. Let-7 inhibiert verschiedene wichtige Onkogene, wie MYC, *High-mobility group AT-hook 2* (HMGA2) oder RAS (miRbase Oktober 2012). So konnte durch Dangi-Garimella et al. gezeigt werden, dass eine erniedrigte Expression von let-7 zu einer erhöhten Konzentration von HMGA2 führt und dadurch pro-invasive und pro-metastatische Gene aktiviert werden (Dangi-Garimella et al. 2009). Für das Adenokarzinom der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel von miRNAs als Prognosemarker geeignet sein können. Wenn im Tumorgewebe let7a-2 niedrig exprimiert war, hatten die Patienten im Vergleich eine geringere Überlebensrate (Yanaihara et al. 2006). Für let-7c konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression im kleinzelligen Zervixkarzinom mit Lymphknotenmetastasierung und einer schlechteren Überlebensrate assoziiert ist (Huang et al. 2012). Yun et al. zeigten, dass let-7c die Bildung von Metastasen beim Mammakarzinom inhibiert (Yun et al. 2011). Auch im kolorektalen Karzinom ist eine verminderte Expression von let-7c mit Metastasierung und einer niedrigeren Überlebensrate assoziiert. In untersuchten Zelllinien führte die verminderte Expression von let-7c zu einer stärkeren Invasion, Migration und Zellmotilität (Han et al. 2012). Eine erniedrigte Expression von let-7a konnte in Metastasen und Rezidiven von Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zu primären Tumoren nachgewiesen werden (Yu et al. 2011). Worley et al. konnten in ihrer Studie anhand der let-7b Expression zwischen hohem und niedrigem Metastasierungspotenzial des Aderhautmelanoms unterscheiden. Eine erniedrigte Expression korrelierte mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial (Worley et al. 2008).

Für miR-26a sind unter anderem die Onkogene SMAD1, HMGA2, „*Phosphatase and Tensin homolog*“ (PTEN), „*Enhancer of zeste homolog 2*“ (EZH2) als Zielgene bekannt (miRbase Oktober 2012). Von Dang et al. konnte nachgewiesen werden, dass in Bronchialkarzinom-Zelllinien in denen miR-26a inhibiert wird, die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung gefördert wird (Dang et al. 2012). Liu et al. bestätigten, dass eine verminderte

Expression von miR-26a das Potential für die Metastasierung in Bronchialkarzinomen erhöht (Liu et al. 2012). Diese Beobachtungen unterstreichen das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bezüglich einer erniedrigten Expression von miR-26a in aggressiven Tumoren. Weiterhin liegt der Genlocus für miR-26a auf dem Chromosomen 3 (miRbase Oktober 2012). In der Einleitung zu dieser Arbeit wurde bereits darauf hingewiesen, dass in NZK häufig ein Verlust dieser Genregion vorliegt.

Auch für die miR-30-Familie haben mehrere Studien einen Einfluss auf Metastasierungsprozesse feststellen können. So konnten Yu et al. in Tierversuchen nachweisen, dass die Herunterregulierung von miR-30 in Mammakarzinomen das Wachstum des Tumors und die Metastasierung begünstigt (Yu et al. 2010). Ein Zielgen von miR-30c ist beispielhaft das Onkogen KRAS. Eine erniedrigte Expression von miR-30c zieht eine Erhöhung von KRAS durch fehlende Inhibition nach sich und es kommt zu verstärkter Proliferation (Tanic et al. 2012). Ein weiterer Einfluss von miR-30 wurde auf die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschrieben. EMT, der Übergang von epithelialen Zellen zu mobilen mesenchymalen Zellen soll einen wichtigen Schritt bei der Metastasierung darstellen (Thiery et al. 2006). MiR-30 inhibiert Snail und Slug. Snail und Slug wiederum sind Proteine, welche die Konzentration von E-Cadherin erniedrigen und damit die EMT induzieren (Boominathan 2010). Wenn miR-30 vermindert exprimiert ist, wie dies in der vorliegenden Arbeit für aggressive metastasierte NZK nachgewiesen wurde, dann könnte die EMT über den eben beschriebenen Signalweg begünstigt werden und damit könnte auch die Entstehung von Metastasen mit bedingt werden.

Für miR-145 konnten diverse Studien ebenfalls einen Einfluss auf die Metastasierung feststellen. So wurde von Fan et al. nachgewiesen, dass eine erniedrigte Expression von miR-145 in Osteosarkoma-Zelllinien mit verstärkter Invasion und Metastasierung einhergeht. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Transfektion von miR-145 eine verminderte Konzentration von VEGF hervorruft (Fan et al. 2012). Für das Magenkarzinom konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen verminderter Expression von miR-145 und verstärkter Invasion und Metastasierung festgestellt werden (Gao et al. 2012).

Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass eine verminderte Expression von let-7, miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 die Metastasierung bei aggressiven synchron metastasierten NZK bedingen könnte. Eine Übersicht der Genloci und der Zielgene der gefunden miRNAs findet sich in Tab. 19.



**Tabelle 18:** Übersicht der Genloci der untersuchten miRNAs und ihrer potentiellen Zielgene. (mirBase Oktober 2012)

miRNA	Genlocus	Zielgene (Bsp.)
let-7a	9q	MYC, HMGA2, RAS
let-7b	22	
let-7c	21q	
miR-26a	3p	SMAD1, HMGA2, PTEN, EZH2
miR-30b	8q	SOX4
miR-30c	1q, 6q	KRAS, Snail, Slug
miR-145	5q	SOX2, MYC, Mucin1

Die Ursachen für die Herunterregulation der miRNA können wie bereits erwähnt durch genomische Alterationen bedingt sein. Die Regulation der miRNA kann ebenfalls auf epigenetischer Ebene stattfinden. Für diverse Tumoren konnte bereits nachgewiesen werden, dass es durch eine Hypermethylierung der miRNA-Genabschnitte zur Inaktivierung der miRNA kommt (Kozaki et al. 2008; Toyota et al. 2008). Auch spielt für die miRNA-Expression die Histonmodifikation durch die Histondeacetylase eine Rolle. Dies konnte an Brustkrebszelllinien durch eine Inhibition der Histondeacetylase und nachfolgende miRNA-Expressionsveränderung gezeigt werden (Scott et al. 2006). Weiterhin kann eine fehlerhafte Biogenese der miRNA zu einer erniedrigten Expression beitragen, z.B. indem die Enzyme Dicer oder Drosha vermindert exprimiert sind (Di Leva et al. 2010). Ein weiterer wesentlicher Mechanismus ist die Rückkopplung über die Target-Proteine, sowohl als positives als auch negatives Feedback. Beispielsweise unterdrückt let-7a die Expression von c-MYC und durch einen negativen Feedback unterdrückt c-MYC wiederum die Expression von let-7a (Sampson et al. 2007).

## 6.2 Diskussion der Methodik der RNA-Isolierung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene RNA-Isolierungsmethoden verwendet, die Isolierung von Gesamt-RNA sowohl mit Trizol als auch einem filterbasiertem Isolierungssystem sowie die Isolierung von angereicherter miRNA durch ein filterbasiertes Isolierungssystem. Diese Methoden beruhen auf unterschiedlichen biochemischen Prinzipien. Mit Trizol wird die Gesamt-RNA mit Hilfe eines Phenol-Guanidin-Isocyanat-Gemisches

isoliert (Chomczynski & Sacchi 1987). Bei der filterbasierten Isolierung wird die organische Extraktion mit einer Isolierung durch Siliziumoxid-Filter kombiniert (Farell 2010).

Nur mit Hilfe der angereicherten miRNA konnten die vorangegangenen Microarray-Untersuchungen bestätigt und signifikante Expressionsunterschiede für die ausgewählten miRNAs festgestellt werden. Da für die Microarrayanalysen ebenfalls angereicherte miRNA verwendet wurde, ist hier die hohe Übereinstimmung mit den qPCR-Daten zu erklären. Darüber hinaus wurde bei den einzelnen Isolierungsmethoden unterschiedliches Probenmaterial verwendet. Somit lag die Vermutung nahe, dass die unterschiedlichen Ergebnisse auch durch das eingesetzte Material hervorgerufen wurden. Allerdings zeigten sich bei einem Vergleich der filterbasierten Isolierungsmethoden mit neun identischen Proben des selben Patientenpools immer noch Unterschiede in den Ergebnissen, so dass diese Differenzen durch die unterschiedlichen Isolierungsmethoden bedingt sein müssen. Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist folglich die Tatsache, dass die einzelnen Isolierungsmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Unterschiede besteht darin, dass bei der Gewinnung von angereicherter miRNA mehr Waschschrte nötig sind und es dadurch zu zusätzlichen Verlusten von miRNA kommen kann. Weiterhin binden miRNAs an komplementäre mRNAs, diese könnten dann bei dem Schritt, bei dem langkettige RNA-Moleküle abgewaschen werden, verloren gehen. Auch Podolska et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die RNA-Isolierungsmethode die zu untersuchenden miRNA-Expressionsprofile beeinflusst und kamen zu der Schlussfolgerung, dass während einer Studie nur eine Methode verwendet werden sollte. In dieser Studie wurden Microarray-Ergebnisse zwischen Gesamt-RNA, welche auf Phenol-Guanidin-Isocyanat-Basis isoliert wurde und angereicherter miRNA, welche durch mirVanaKit isoliert wurde, verglichen. Die Unterschiede in den miRNA-Expressionsergebnissen erklärten sich Podolska et al. ebenfalls durch den Verlust gebundener miRNAs an größere RNA-Moleküle. Weiterhin wurde in dieser Studie diskutiert, dass in Gesamt-RNA auch pre-miRNA vorhanden sein können, welche dann ebenfalls an den Microarrays binden (Podolska et al. 2011). Coppola et al. verglichen verschiedene miRNA-Expressionsstudien bei Prostatakarzinomen und stießen auf kontroverse Ergebnisse. Es wurden diverse Erklärungsansätze diskutiert. Einerseits wurde davon ausgegangen, dass die Unterschiede in den Patientengruppen, z.B. bezüglich Tumorstadien und Vorbehandlungen, Einfluss auf die miRNA-Expression haben könnten. Weiterhin wurden als Einflussfaktoren die uneinheitliche Gewebegewinnung und -lagerung und die Kontamination des Gewebes z.B. mit Bindegewebe oder gesundem Gewebe angesprochen. Aber auch in

dieser Studie wurde auf Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Studien, in denen Gesamt-RNA oder angereicherte miRNA verwendet wurde, hingewiesen (Coppola et al. 2010).

Masotti et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass mit verschiedenartigen RNA-Isolierungsmethoden unterschiedliche Ausbeuten von kleinkettigen RNAs zu erzielen sind. Die höchste Ausbeute erreichten sie mittels Trizol (22-34 % kleinkettige RNAs von der Gesamt-RNA) (Masotti et al. 2009). Bei der Isolierung durch Trizol ist die Verunreinigung durch Lösungsmittel allerdings relativ hoch, so dass die fehlenden miRNA-Expressionsunterschiede bei dieser Isolierungsmethode eventuell durch den störenden Einfluss der Lösungsmittel auf die qPCR zu erklären sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorangegangenen Microarrayanalysen, welche mit angereicherter miRNA durchgeführt wurden, mit der qPCR, welche ebenfalls mit angereicherter miRNA durchgeführt wurde, bestätigt werden konnten. Allerdings zeigten sich Unterschiede in den Ergebnissen der qPCR zwischen den einzelnen Isolierungsmethoden. Dies impliziert, dass bei Untersuchungen bezüglich der miRNA-Expression nur eine Isolierungsmethode kontinuierlich in einer Studie verwendet werden sollte. Für weitere Studien ist die Verwendung von Gesamt-RNA zu empfehlen. Dies begründet sich darin, dass selektive Verluste bei der Verwendung von Gesamt-RNA eher auszuschließen sind. Die Verwendung von angereicherter miRNA kann zwar einen Biomarker evaluieren, gibt aber eventuell nicht den vollständigen aktuellen Zustand der miRNA-Expression im Gewebe wieder. Weiterhin können bei der Isolierung durch weniger Waschschrte Zeit und Kosten eingespart und potentielle Fehlerquellen vermieden werden. Wahrscheinlich aufgrund dessen wird aktuell in den meisten Studien die miRNA-Expression anhand von Gesamt-RNA untersucht, so dass hier eher eine Vergleichbarkeit gegeben ist.

### **6.3 Diskussion der funktionellen Analysen**

Um die Bedeutung der miRNA-Expression auf wesentliche Schritte der Metastasierung zu untersuchen, wurden funktionelle Analysen bezüglich Proliferation, Migration und Invasion durchgeführt.

Für die Analysen wurde let-7c ausgewählt, da diese miRNA in den Expressionsanalysen und den erstellten Überlebenskurven die deutlichste Assoziation mit der Metastasierung des klarzelligen NZK gezeigt hatte. Weiterhin wurde – wie bereits in Kapitel 6.1 diskutiert – für

viele andere Tumorentitäten belegt, dass let-7c eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielt. Als Modellzelllinie wurde 786-O gewählt, welche aus einem primär klarzelligen NZK stammt. White et al. und auch Song et al. verwendeten in ihren funktionellen Analysen in vitro die Zelllinie 786-O. Bei White et al. konnte gezeigt werden, dass eine niedrigere Expression von miR-215 eine erhöhte Migration und Invasion begünstigt (White et al. 2011b). Song et al. belegten, dass miR-138, über eine negative Regulation von HIF-1a, die Apoptoserate der Zellen erhöhte und sowohl Proliferations- als auch Migrationsfähigkeit verringerte (Song et al. 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand eine Etablierung der Zellversuche statt. So wurden optimale Konzentrationen für miRNA-Mimic oder Inhibitor und das Transfektionsreagenz HiPerfect definiert. Weiterhin konnte die Spezifität der Transfektion nachgewiesen werden.

Bei den durchgeführten Versuchen ist zunächst davon ausgegangen worden, dass das Transfektionsreagenz das Verhalten der Zellen nicht oder nur unwesentlich beeinflusst. Dadurch wurden als Negativkontrollen nur unbehandelte Zellen verwendet. Diese Annahme stellte sich allerdings während der Versuche als nicht richtig heraus. Das Transfektionsreagenz HiPerfect hat einen negativen Effekt auf Proliferation, Migration und Invasion der Zellen. Somit wären als Negativkontrollen mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen adäquater gewesen. Angesichts dieser Tatsache sind die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der miRNA auf das Verhalten der Zellen kritisch zu sehen.

Versuche, in denen die Negativkontrollen mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen darstellten, wurden in begrenztem Maße durchgeführt, so dass bei den Ergebnissen nur von Tendenzen zu sprechen ist. Es zeigte sich, dass mit let-7c transfizierte Zellen stärker proliferieren, migrieren und invadieren. Die Annahme war hingegen, dass Zellen, in denen let-7c höher exprimiert ist, stärker proliferieren und weniger stark migrieren und invadieren, da in aggressiven synchron metastasierten Tumoren let-7c niedrig exprimiert ist. Nur für die Invasion konnte auch gezeigt werden, dass Zellen, bei denen let-7c inhibiert wurde, stärker invadieren. Es ist davon auszugehen, dass diese widersprüchlichen Ergebnisse durch die geringe Anzahl der Versuche zu erklären sind.

Es handelt sich bei den funktionellen Analysen um initiale Versuche. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Es konnte kein signifikanter direkter Einfluss von let-7c auf die untersuchten Prozesse festgestellt werden. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der falsch gewählten Kontrollgruppe. In weiterführenden Versuchen sollten als Kontrollgruppe mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen verwendet werden. Weiterhin ist es denkbar, dass der optimale Zeitpunkt, zu dem Veränderungen im Verhalten der Zellen auftreten, nicht

richtig erfasst wurde. Dieser Problematik könnte mit der Verwendung einer Echtzeit-Zellanalyse begegnet werden. Dabei kann das Verhalten der Zellen kontinuierlich über Mikroelektroden, die die Impedanzänderung messen, untersucht werden. Die Möglichkeit einer Echtzeit-Analyse war, während die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, nicht gegeben. Weiterhin ist es möglich, dass let-7c andere zelluläre Eigenschaften beim klarzelligen NZK reguliert, als untersucht wurden. So könnten die Differenzierung, die Apoptose oder auch die Angiogenese beeinflusst werden. Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. Eventuell müssen auch mehrere miRNAs gemeinsam verändert werden, um das Verhalten der Zellen beeinflussen zu können. Ein weiterer Faktor, der bedacht werden muss, ist die Tatsache, dass es sich bei der verwendeten Zelllinie bereits um eine entdifferenzierte Zelllinie handelt. Die funktionellen Analysen müssten auch an anderen Zelllinien durchgeführt werden. In Zukunft sollten die Untersuchungen auch an Primärkulturen durchgeführt werden. Diese geben ein realeres Bild des Tumors wieder und der ursprüngliche Charakter der Zellen bleibt weitestgehend erhalten.

## 7. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die miRNA-Expression in metastasierten NZK zur Unterscheidung zwischen synchron, spät und nicht metastasierten Tumoren untersucht.

Bezugnehmend auf die Zielstellung der Arbeit ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- (1) Wenn angereicherte miRNA untersucht wird, besteht für aggressive synchron metastasierte Tumoren eine signifikant niedrigere Expression der miRNAs let-7a, b, c, miR-26a, miR-30b, miR-30c und miR-145 im Vergleich zu spät und nicht metastasierten Tumoren.
- (2) Die untersuchten miRNAs könnten sich als potentielle prognostische Biomarker bezüglich Metastasierung und Überleben eignen. Eine erniedrigte Expression von let-7c ist mit einem verkürzten progressionsfreien 5-Jahres-Überleben korreliert. Eine erniedrigte Expression von let-7a, let-7c, miR-26a, miR-30b und miR-30c korreliert mit einem verkürzten tumorspezifischen-5-Jahres-Überleben.
- (3) Es bestehen Unterschiede zwischen den einzelnen RNA-Isolierungsmethoden in Hinblick auf die Ergebnisse der miRNA-Expression. Jede Isolierungsmethode sollte einzeln ausgewertet werden und in einer Studie nur eine Isolierungsmethode verwendet werden.
- (4) Welchen Einfluss die miRNA-let7c auf Proliferation, Migration und Invasion in der NZK-Zelllinie 786-O hat, konnte mit der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend geklärt werden. Allerdings wurde der Versuchsaufbau etabliert und kann ggf. auch unter Zuhilfenahme einer Echtzeit-Zellanalysen erweitert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die vorangegangenen Microarrayversuche anhand von angereicherter miRNA validiert werden und potentielle Biomarker für das metastasierte NZK detektiert werden. Um die klinische Relevanz der identifizierten miRNAs als Biomarker bewerten zu können, sollten prospektive Studien an einer größeren unabhängigen Patientenkohorte durchgeführt werden. Weiterhin wäre es für Biomarker vorteilhaft, sie in leicht zu gewinnendem Probenmaterial nachweisen zu können. In einer prospektiven Studie sollten demzufolge auch Urin und Serum auf spezifische deregulierte miRNAs und ihre Korrelation mit der Metastasierung untersucht werden. Bislang sind Studien vorhanden, die die unterschiedliche miRNA-Expression im Serum zwischen gesunden Probanden und Probanden mit NZK unterschiedlichen Subtyps verglichen haben. Wulfken et al. konnte

anhand der Serumkonzentration von miR-1233 einen potentiellen Biomarker für NZK unterschiedlichen Subtyps finden (Wulfken et al. 2011). Redova et al. konnten anhand von unterschiedlichen miRNA-Konzentrationen in Serumproben zwischen gesunden und an NZK erkrankten Patienten differenzieren (Redova et al. 2012).

Es wurde bereits erwähnt, dass die Anzahl der durchgeführten funktionellen Analysen nicht ausreichend ist, um die Bedeutung der gefundenen miRNAs bezüglich ihres Einflusses auf das Verhalten der Zellen zu sichern. Hier muss eine Erhöhung der Versuchszahl erfolgen. Die Versuche sollten auch an anderen NZK-Zelllinien und an Primärkulturen durchgeführt werden. Auch wurde bisher von den identifizierten miRNAs nur let-7c untersucht.

Weiterhin sollten die Ursachen für die Deregulation der miRNAs betrachtet werden. Die Ursachen könnten auf Ebene der Mutation oder Methylierung von Genen gesucht werden. Die Targets der gefundenen miRNAs im NZK müssen untersucht werden, um die beeinflussten Signalwege und die funktionelle Bedeutung zu verstehen. Aus den Ursachen oder Auswirkungen der miRNA-Deregulation könnten sich ggf. neue Therapiemöglichkeiten ergeben.

## 8. Literatur- und Quellverzeichnis

Bail S, Swerdel M, Liu H et al. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 2010; 16:1032-9.

Batzler W, Giersiepen K, Hentschel S. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. In: 6. überarbeitete Auflage edn. Berlin: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.; 2008.

Bedke J, Buse S, Kurosch M et al. Paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma. *Urologe A* 2007; 46:45-8.

Boominathan L. The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29:613-39.

Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark* 2010; 9:461-73.

Calin G, Dumitru C, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15524-9.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:2999-3004.

Chatterjee S, Grosshans H. Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2009; 461:546-9.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.

Chow T, Youssef Y, Lianidou E et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin Biochem* 2010; 43:150-8.

Chow W, Gridley G, Fraumeni JJ et al. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 2000; 343:1305-11.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:13944-9.

Coppin C. Immunotherapy for renal cell cancer in the era of targeted therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8:907-19.

Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17:F1-17.

Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 2007; 115:1090-106.



- Dang X, Ma A, Yang L et al. MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells. *Cancer Genet* 2012; 205:113-23.
- Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM et al. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J* 2009; 28:347-58.
- Davis B, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 2009; 7:18.
- Delakas D, Karyotis I, Daskalopoulos G et al. Nephron-sparing surgery for localized renal cell carcinoma with a normal contralateral kidney: a European three-center experience. *Urology* 2002; 60:998-1002.
- Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med* 2010; 16:257-67.
- Diaz J, Mora L, Hakam A. The Mainz Classification of Renal Cell Tumors. *Cancer Control* 1999; 6:571-9.
- Diederichs S, Haber D. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 2007; 131:1097-108.
- Eble J, Sauter G, Epstein J. Pathology and Genetics Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press International Agency for Research on Cancer; 2004.
- Edmonds MD, Hurst DR, Vaidya KS et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expression. *Int J Cancer* 2009; 125:1778-85.
- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007; 370:2103-11.
- Esquela-Kerscher A, Slack F. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:259-69.
- Fan L, Wu Q, Xing X et al. MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012; 44:407-14.
- Farell R. RNA Methodologies. London: Elsevier; 2010.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:453-8.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9:102-14.
- Fischer C, Oberneder R. Nierenzellkarzinom, in: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien. In: Deutsche Krebsgesellschaft; W. Zuckschwerdt Verlag; 2008: 103-12.

Fuhrman S, Lasky L, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:655-63.

Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* 2007; 9:604-11.

Gago-Dominguez M, Yuan J, Castelao J et al. Family history and risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1001-4.

Gago-Dominguez M, Yuan J, Castelao J et al. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81:542-8.

Gao P, Xing AY, Zhou GY et al. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer. *Oncogene* 2012.

Gore M, Griffin C, Hancock B et al. Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): an open-label randomised trial. *Lancet* 2010; 375:641-8.

Gottardo F, Liu C, Ferracin M et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007; 25:387-92.

Hammerschmied C, Walter B, Hartmann A. Renal cell carcinoma 2008. Histopathology, molecular genetics and new therapeutic options. *Pathologe* 2008; 29:354-63.

Han HB, Gu J, Zuo HJ et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol* 2012; 226:544-55.

Han J, Lee Y, Yeom K et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18:3016-27.

Hartmann J, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19:1541-3.

Hawkins PG, Morris KV. RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* 2008; 7:602-7.

Huang L, Lin JX, Yu YH et al. Downregulation of six microRNAs is associated with advanced stage, lymph node metastasis and poor prognosis in small cell carcinoma of the cervix. *PLoS One* 2012; 7:e33762.

Huang Y, Dai Y, Yang J et al. Microarray analysis of microRNA expression in renal clear cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35:1119-23.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:2271-81.

Hutvagner G, Zamore P. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297:2056-60.

Jansohn M. Gentechnische Methoden. 4. Auflage ed. München: Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag; 2007.

Juan D, Alexe G, Antes T et al. Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer. *Urology* 2010; 75:835-41.

Junker K, Steiner T, Sanjmyatav J et al. Tumor profiling of renal cell tumors: relevance for diagnostics and therapy. *Pathologie* 2009; 30:105-10.

Junker K, Weirich G, Amin MB et al. Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162:169-75.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A et al. Krebs in Deutschland 2007/2008. In. Berlin: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.; 2012.

Kane C, Mallin K, Ritchey J et al. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer* 2008; 113:78-83.

Kath R. Nierenzellkarzinom Diagnostik und systemische Therapieoptionen. *Der Onkologe* 2005; 11:593–606.

Kim W, Kaelin W. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:4991-5004.

Knight S, Bass B. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 293:2269-71.

Kondo K, Yao M, Yoshida M et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34:58-68.

Kozaki K, Imoto I, Mogi S et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008; 68:2094-105.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39:673-7.

Lee R, Feinbaum R, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75:843-54.

Lee Y, Ahn C, Han J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425:415-9.

Lee Y, Kim M, Han J et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23:4051-60.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120:15-20.

- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW et al. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115:787-98.
- Liu B, Wu X, Wang C et al. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. *Biochim Biophys Acta* 2012.
- Ljungberg B, Cowan N, Hanbury D et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2010 Update. *Eur Urol* 2010.
- Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834-8.
- Lund E, Güttinger S, Calado A et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303:95-8.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449:682-8.
- Ma L, Weinberg RA. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet* 2008; 24:448-56.
- Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 2005; 19:2979-90.
- Masotti A, Caputo V, Da Sacco L et al. Quantification of small non-coding RNAs allows an accurate comparison of miRNA expression profiles. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009:659028.
- Michael S. Modern Therapeutic Approaches in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *EAU-EBU Update Series* 2007; 5:26-37.
- Motzer R, Hutson T, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:115-24.
- Motzer R, Mazumdar M, Bacik J et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:2530-40.
- Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol* 2008; 216:418-27.
- Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M et al. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:293-302.
- Oberling C, Riviere M, Haguneau F. Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature* 1960; 186:402-3.
- Ozsolak F, Poling L, Wang Z et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008; 22:3172-83.

- Pesch B, Haerting J, Ranft U et al. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int J Epidemiol* 2000; 29:1014-24.
- Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 2007; 26:611-23.
- Petillo D, Kort E, Anema J et al. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol* 2009; 35:109-14.
- Podolska A, Kaczkowski B, Litman T et al. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta Biochim Pol* 2011; 58:535-40.
- Prasad S, Humphrey P, Catena J et al. Common and uncommon histologic subtypes of renal cell carcinoma: imaging spectrum with pathologic correlation. *Radiographics*; 26:1795-806; discussion 806-10.
- Redova M, Poprach A, Nekvindova J et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2012; 10:55.
- Remzi M, Marberger M. Renal tumor biopsies for evaluation of small renal tumors: why, in whom, and how? *Eur Urol* 2009; 55:359-67.
- Risler T, Kühn K. *Facharzt Nephrologie*. 1. Auflage ed. München; Jena: Urban und Fischer; 2008.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14:1902-10.
- Sampson VB, Rong NH, Han J et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 2007; 67:9762-70.
- Sarnow P, Jopling CL, Norman KL et al. MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:651-9.
- Schaefer A, Jung M. Mikro-RNA in der Uroonkologie. *Der Urologe* 2009; 8:877-85.
- Schaefer-Prokop CM. Bildgebende Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe* 1998a; 4.
- Schaefer-Prokop CM. Bildgebende Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe* 1998b; 4 : 221-228.
- Schaps, Kessler, Fetzner. *Das zweite - kompakt: Grundlagen*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2008.
- Schenck M, Muegge L-O. „Targeted therapy“ bei metastasiertem Nierenzellkarzinom. *Der Onkologe* 2010; 16:157-67.
- Scott G, Mattie M, Berger C et al. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66:1277-81.

Seizinger B, Rouleau G, Ozelius L et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 1988; 332:268-9.

Setiawan V, Stram D, Nomura A et al. Risk factors for renal cell cancer: the multiethnic cohort. *Am J Epidemiol* 2007; 166:932-40.

Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:90.

Song T, Zhang X, Wang C et al. MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:1307-11.

Störkel S. Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation. *Urologe A* 1999; 38:425-32.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64:3753-6.

Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *PLoS One* 2012; 7:e38847.

Theis R, Dolwick Grieb S, Burr D et al. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC Cancer* 2008; 8:387.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:131-42.

Thoenes W, Störkel S, Rumpelt H. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 1986; 181:125-43.

Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68:4123-32.

Tsai WC, Hsu PW, Lai TC et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49:1571-82.

van der Poel H, Roukema J, Horenblas S et al. Metastasectomy in renal cell carcinoma: A multicenter retrospective analysis. *Eur Urol* 1999; 35:197-203.

Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 2009; 136:586-91.

Verine J, Pluvineau A, Bousquet G et al. Hereditary renal cancer syndromes: an update of a systematic review. *Eur Urol* 2010; 58:701-10.

- White NM, Bao TT, Grigull J et al. miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *J Urol* 2011a; 186:1077-83.
- White NM, Khella HW, Grigull J et al. miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215. *Br J Cancer* 2011b; 105:1741-9.
- Williams RD, Elliott AY, Stein N et al. In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines. *In Vitro* 1978; 14:779-86.
- Wittekind C. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2010.
- Woodward E, Clifford S, Astuti D et al. Familial clear cell renal cell carcinoma (FCRC): clinical features and mutation analysis of the VHL, MET, and CUL2 candidate genes. *J Med Genet* 2000; 37:348-53.
- Worley LA, Long MD, Onken MD et al. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Res* 2008; 18:184-90.
- Wotschovsky Z, Liep J, Meyer HA et al. Identification of Metastamirs as Metastasis-associated MicroRNAs in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Int J Biol Sci* 2012; 8:1363-74.
- Wu X, Weng L, Li X et al. Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS One* 2012; 7:e35661.
- Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One* 2011; 6:e25787.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9:189-98.
- Yi Z, Fu Y, Zhao S et al. Differential expression of miRNA patterns in renal cell carcinoma and nontumorous tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136:855-62.
- Yu CC, Chen YW, Chiou GY et al. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. *Oral Oncol* 2011; 47:202-10.
- Yu F, Deng H, Yao H et al. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene* 2010; 29:4194-204.
- Yuan J, Castela J, Gago-Dominguez M et al. Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:429-33.
- Yun J, Frankenberger CA, Kuo WL et al. Signalling pathway for RKIP and Let-7 regulates and predicts metastatic breast cancer. *EMBO J* 2011; 30:4500-14.

## **9. Anhang**

### **9.1 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. K. Junker und Dipl.-Biol. Joana Heinzelmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers



## 9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die Vergabe dieses interessanten Themas und für ihre umfassende und engagierte Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl.-Biol. Joana Heinzelmann, die mich in die experimentellen Methoden einarbeitete, mit mir die Ergebnisse kritisch betrachtete und meine Arbeit Korrektur las. Sie hat mir den Zugang zur wissenschaftlichen Forschung gelehrt, mir bei allen Fragen zur Seite gestanden und mit einem „alles wird gut“ über Durststrecken hinweg geholfen.

Den Mitarbeitern des Molekularbiologischen Forschungslabors der Klinik für Urologie, des Universitätsklinikums Jena danke ich für die herzliche Aufnahme in ihr Team und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für Hilfestellungen jeglicher Art möchte ich mich insbesondere bei Frau Dipl.-Biol. Astrid Enkelmann, Frau Dipl.-Biol. Martina Walter, Beate Ziegenhardt und Bianca Ilse bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, insbesondere Benjamin, Georg, Julia, Martin (ohne den die Abbildungen niemals so schön geworden wären), Nadine, Peter, Philipp und Susanne für motivierende Worte, Ratschläge, Unterstützung bei „technischen Problemen“ und für eine tolle Studentenzeit.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, ohne deren liebevolle Unterstützung ein Medizinstudium und diese Arbeit nie möglich gewesen wären. Danke, dass ihr immer da seid, wenn ich Euch brauche.